GE Healthcare
Life Sciences

MicroCal iTC$_{200}$ System

日本語簡易マニュアル

GE imagination at work

71-3508-33

目次

はじめに 6

ご使用の前に 6

設置環境 6

実験をはじめる前に 7

等温滴定カロリメトリー（ITC）の原理 7

概要 8

解析データ 9

サンプルの調製時の注意点 10

緩衝液組成 10

透析 10

DMSO などの有機溶媒の使用 11

還元剤 11

凝集試験 11

ITC 実験のデザイン 12

必要サンプル量 12

必要濃度 12

高分子サンプルの濃度 12

滴定シリンジのリガンド濃度 13

滴下量および滴下回数 13

コントロール実験 13

実験温度 13

結合が非常に強い場合（K_D = 10^{-8} M 程度以下） 14

結合が非常に弱い場合（K_D = 10^{-4} 程度以上） 14

シミュレーションソフトウェアを用いた実験デザイン 15

測定 16

測定概要 16

1. システムのスタートアップと準備 16

2. Ca^{2+}/EDTA 結合実験 18

2–1. パラメータ設定 18

2–2. 測定前の洗浄作業 21
2–3. サンプルのセットと測定 25
2–4. ベースライン安定の目安 27
2–5. 測定中の適定パラメータの変更方法 29
2–6. コントロール実験 29
2–7. データ解析 30
2–7–1. 測定データの読み込み 30
2–7–2. 画面上に 2 つのデータを表示 33
2–7–3. コントロールの差し引き 36
2–7–4. バッドデータの削除 39
2–7–5. データフィッティング 39
2–7–6. フィッティングモデル 41
2–7–7. ベースライン、積分範囲の再計算 42
2–7–8. Experimental Design を利用した実験デザイン 47

メンテナンス 49

毎日のメンテナンス 49
毎週のメンテナンス 49
長期間使用しないとき 49
その他のメンテナンス 49
汚れがひどいときの洗浄方法 49
洗浄ボタンについて 50
システムチェック 51
Y-Axis キャリブレーション 52
シャットダウン 54

はじめに

ご使用の前に

MicroCal iTC$_{200}$ を操作するユーザーの皆様は実験前にこの日本語簡易マニュアルをよくお読みいただき、一通りの操作方法を習得の上で本実験に臨んでいただけますようお願いいたします。機器本来のパフォーマンスを十分に発揮させるためだけでなく、誤った操作方法等による装置への取り返しのつかないダメージを防ぐためにも重要です。本装置は pV（ピコボルト）オーダーの電力を取り扱うため、非常に高性能、高感度な実験装置であることを十分ご理解の上ご使用いただきますようお願い申し上げます。

設置環境

PC コントローラ付きの MicroCal iTC$_{200}$ を設置するには、少なくとも通常の実験台（幅 70 cm 程度）が必要となります。設置場所は風、室温変動、直射日光、振動、強い電場や磁場（NMR や電子レンジ、大型モータ、冷蔵設備など）がないところにしてください。さらに電源（110～240 VAC）が適切に設置され、電圧変動、同期ひずみ、ディップやスパイクが乗っていないことが必要です。

ほとんどの実験室条件下ではこの装置に内蔵の電源フィルタで十分ですが、場合によっては外部ノイズが装置の性能発揮を妨げることがあります。そのような場合には、電源安定装置を併用することが必要になります。電源に起因するトラブルはさまざまな形であらわれ、すべてのケースに有効な電源安定化装置はありません。電源安定化装置を購入する場合は、その前に実際に使用する場所で予備テストしてみることをおすすめします。電源由来のトラブルが考えられる場合には、弊社技術サービスにご相談ください。

繰り返しになりますが、エアコンのオン・オフにともなう室温変動、室内の風、あるいは装置への直射日光、空間電磁波などは動作に微妙に影響しますから十分にお気を付けください。

実験をはじめる前に

等温滴定カロリメトリー（ITC）の原理

等温滴定型カロリメーター（以下 ITC）は、温度一定条件下において 2 種の分子が相互作用するときに生じる反応熱を直接測定します。ITC は、結合パートナーが混合されるときに生じるリファレンスセルとサンプルセルとの間の温度差をゼロに保つためにセルヒーターにかかる電力の差を測定することによって、熱変化を測定します。

MicroCal iTC$_{200}$ はハステロイ製の 2 つのコイン型のセル（リファレンスセル、およびサンプルセル）が半導体熱伝導センサーを挟んで断熱ジャケット内に設置されています。また、セルの外側にはそれぞれ補償ヒーターが装着されています。これらは二重の断熱シールドに覆われ、シールド外部との熱交換を極力抑えるように設計および制御されています。サンプルセル、リファレンスセルには導入管を通じてサンプル試料等が挿入される構造をしています。

熱の発生や吸収が起きていないときは、この 2 つのセル間の温度差はゼロになっています。しかし、リガンドが滴定されると、サンプルセル内で発熱あるいは吸熱反応が生じ、2 つのセル間に温度差が生じます。この温度差を半導体熱伝導センサーが検知し、2 つのセルの温度差がゼロになるように制御がかかります。つまり、この平衡維持のために変化する補償電力量（フィードバックパワー）をプロットすることにより、反応熱量を測定することが可能となります。

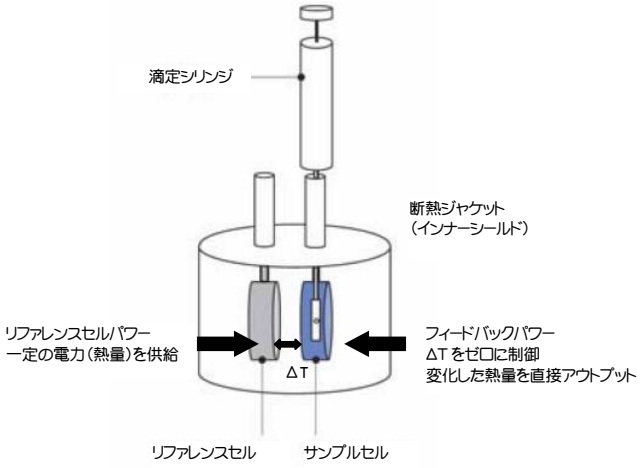


図 1. MicroCal iTC$_{200}$ システム略図

概要

図 2. MicroCal iTC_{200} System

	パーツ名
1	ピペット
2	洗浄モジュール
3	タワー
4	セルユニット

MicroCal iTC_{200} 等温滴定型カロリメーターを用いて、結合エネルギーに関する詳細な知見を得ることができます。本システムは 200 µl のサンプルセル（必要サンプル量は 300µl 以上）を有しており、正確にコントロールされた量のリガンドを滴下することで生じる吸熱または発熱反応を直接測定します。滴定シリンジの容量は 40 µl（必要サンプル量は 60 µl 以上）です。

サンプルセルおよびリファレンスセルは、耐薬品性、熱伝導性に優れた物質であるハステロイ ™ 合金製を使用しています。

リファレンスセルには通常、水を充填します。サンプルセルには高分子溶液を充填します。（サンプルは高分子のことが多いですが必ずしもそうである必要はありません）撹拌シリンジにリガンドを充填し、サンプルセルに挿入します。セル内でのリガンド濃度が

サンプル濃度の 2～3 倍になるまで、通常 0.5～2 µl の容量でサンプルセルに滴下します。リガンドを滴下するごとに発生する熱パルスを、時間に対して積分し、濃度に対してプロットすると、kcal/mol 対モル比（リガンド／サンプル）の滴定曲線を作成できます。これらの作業はソフトウェアの制御下で行われます。よって、ユーザーは実験パラメータ（温度、注入回数、注入量など）を入力するだけであとは自動的に測定が行われます。

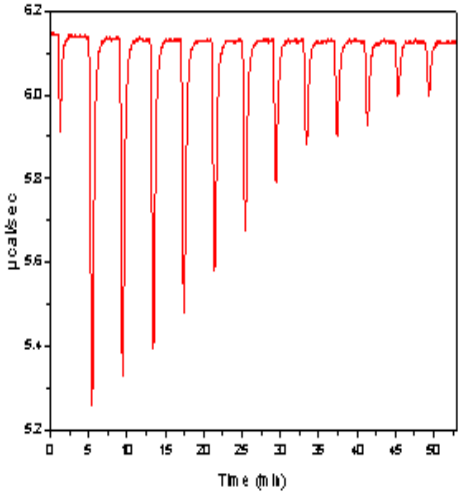
測定終了後、Origin ソフトウェアを用いて得られたデータを解析します。結合モデルでフィッティングを行い、相互作用のアフィニティー（K_A）、ストイキオメトリー（N）およびエンタルピー（ΔH）を求めます。

また、MicroCal iTC$_{200}$ は洗浄モジュールも備えているため徹底的な洗浄を行うことができます。

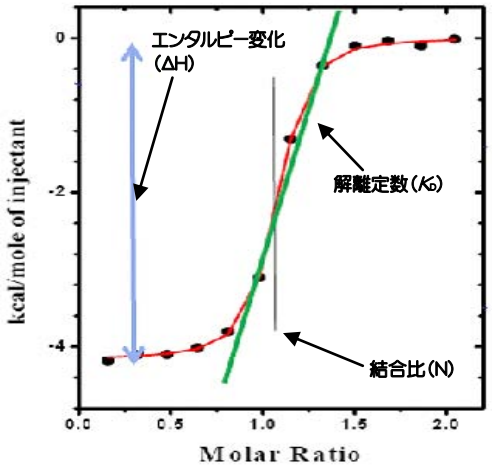
解析データ

測定が終了すると Raw Data が得られます。Raw Data は Origin ソフトウェアによってモル比あたりのエンタルピー変化を表すデータに変換されます。

Raw Data



ΔH Data



変換されたデータからリガンドモルあたりの結合量エンタルピー変化が求められます。また、フィッティングを行うことにより解離定数（K_D）と結合のエンタルピー変化（ΔH）が求められます。また、ギブスの自由エネルギー変化の理論式より自由エネルギー変化（ΔG；式①）とエントロピー変化（ΔS；式②）が求められます。

◆ギブスの自由エネルギー変化

$$\Delta G = -RT\ln(1/K_D) = \Delta H - T\Delta S \quad (①, ②)$$

R：　気体定数
T：　絶対温度
青字：フィッティングで求まる値
赤字：理論式より求まる値

サンプルの調製時の注意点

MicroCal iTC$_{200}$ は、リガンド溶液を反応セル内のサンプル（通常はタンパク質）溶液に滴下し、一定温度で混合したときの結合熱を測定するように設計されています。リガンド溶液をサンプル溶液に滴下すると、以下の要因から熱変化が生じます：

1　対象分子間の相互作用

2　反応体である分子に関連する希釈熱

3　他の溶媒および溶質の成分濃度の違い（ミスマッチ）から生じる混合熱および希釈熱

緩衝液組成

ITC 実験を成功させるポイントは、混合する溶液間のミスマッチから生じる熱変化を最小限に抑えることです。組成の不一致があるとバックグラウンド熱が大きくなり、場合によっては測定したい結合の熱量を大きく上回り、結合熱量の決定が困難となる場合があります。

最も一般的なミスマッチはリガンド溶液とサンプル溶液との pH の違いですが、塩濃度、緩衝液濃度のミスマッチの影響もあります。使用する緩衝液は一般的にプロトネーションエンタルピーの補正が無視できる、あるいは必要のないリン酸緩衝液、酢酸緩衝液、カコジル酸緩衝液が理想的です。トリス緩衝液などの Good の緩衝液は厳密に結合エンタルピーを得るためには補正が必要となりますが、一般に K_A や n には無関係と考えられています。なお、塩濃度の目安は 50～100 mM です。pH については溶液間の差異が 0.05 以下であることが目安です。これらの違いを最小化するために、サンプルは可能なかぎり同一組成の緩衝液を用いて調製します。

透析

すべてのサンプルの緩衝液組成や濃度条件が同じになるよう、高分子とリガンドを同時に透析することをおすすめします。透析できない低分子のリガンドの場合には、高分子を透析後、透析外液にリガンドを直接溶解することによって調製することができます。

別のコントロール実験でリガンド溶液を透析外液に滴下することによって、緩衝液の違いから生じる熱変化も求めることができます。ただし、添加剤や塩などの残存成分を含む固形製剤（合成ペプチドや合成ヌクレオチドなど）の溶解には注意が必要です。溶解後、溶液の pH を精密な pH メーターを使ってチェックします。リガンド溶液の pH が緩衝液の pH から 0.05 単位以上離れている場合には、少量の HCl または NaOH 溶液を用いて緩衝液の 0.05 単位以内になるようにリガンド溶液の pH を調整します。

塩濃度の小さな違いによって生じる熱変化は、未調整溶液の pH の違いによって生じる熱変化よりも小さくなります。

DMSO などの有機溶媒の使用

一部のリガンドは溶解度が低いために直接緩衝液に溶解させることができないので、最初に 100%の DMSO または他の有機溶媒に高濃度（可能であれば 10～100 mM 以上）で溶解させます。その後、最終 DMSO 濃度になるように DMSO の含まれない緩衝液で希釈します。次に、目的のリガンド濃度になるように最終 DMSO 濃度含有の測定用緩衝液で希釈します。リガンド溶液中の DMSO などの有機溶媒濃度は、できるだけ低く（1～2%が好ましいが通常は 5%未満）保ち、溶媒のミスマッチによる大きな熱変化を避けます。リガンドとセル内サンプルを可能なかぎり高倍率で同一の測定用緩衝液を用いて希釈したほうが溶媒のミスマッチの影響を減らすことができます。

還元剤

一部の還元剤によって、ベースラインのドリフトが起こることがあります。タンパク質の安定のために還元剤が必要である場合には、β-メルカプトエタノール（< 5 mM）または TCEP（トリス［2-カルボキシエチルホスフィン］塩酸塩、< 2 mM）の使用を推奨します。（ただし、DTT で影響のでない場合もあります）

凝集試験

凝集を伴う反応から得られたデータからの正確な結合の熱力学量を得ることはできません。凝集の恐れがあれば ITC の実験を行う前に、調製した試料の一部を使った反応による凝集の有無をご確認いただくことをおすすめします。

ITC 実験のデザイン

必要サンプル量

MicroCal iTC$_{200}$ の 1 回の測定に必要な最小サンプル量は以下の通りです。

滴定型シリンジ側： ～60 µl
セル側 ： ～300 µl

必要濃度

濃度設定は結合の強さによって変わりますが、おおよその目安は以下の通りです。

滴定シリンジ側 ： K_D × 50 ～ 100
セル側 ： K_D × 5 ～ 10

＊詳細については以下の「高分子サンプルの濃度」を参照ください。

高分子サンプルの濃度

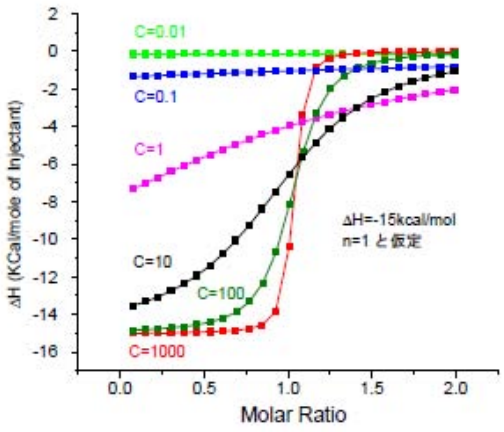
セル内のサンプル（通常は高分子）の適正濃度は、結合アフィニティー、結合部位の数、および結合熱ΔH に依存します。これらの要因は Wiseman ら（*Anal. Biochem.* 179, 131 (1989)）によって詳細に検討されており、彼らは ITC 実験デザインに役立つ以下の式を導きだしました：

$$c = n \cdot M_{tot} \cdot K_A = \frac{n \cdot M_{tot}}{K_D}$$

n： 結合ストイキオメトリー（サンプル分子上のリガンド結合部位の数）
M_{tot}： セル内のサンプル分子のモル濃度
K_A： 結合定数
K_D： 解離定数

よって、1:1 結合の場合、推奨濃度は c/K_A すなわち cK_D となります。

解離定数を決定するためにはシグモイド型のサーモグラムを得る必要があります。このサーモグラムの形状はセル側の高分子濃度によって決まります。そして、この濃度は上記式で求められる C 値の範囲を 1 ～ 1000 の範囲に入るようにすることによって得られます。C 値が 5 ～ 250 の間に入ると理想的なシグモイド型のサーモグラムになります。



1:1 の結合で高分子濃度が 10 μM の場合
K_D = 0.1 μM のとき、
C = 10×10^{-6}÷10^{-7} = 100（理想的なシグモイドカーブ）

K_D = 100 μM のとき、
C = 10×10^{-6}÷10^{-4} = 0.1（熱変化が見られない）

滴定シリンジのリガンド濃度

1:1 結合反応の場合、滴定シリンジ内のリガンドのモル濃度は、セル内のサンプル分子のモル濃度よりも通常 10～20 倍高くします。これにより、滴定実験終了までにセル内の物質を飽和させるか飽和に近い状態にすることができます。

滴下量および滴下回数

MicroCal iTC_{200} による通常の実験では、各 2 μl で 18 回滴下を行います。ただし、1 回目の滴下で時折見られる滴下前のセル内、およびピペット内での液体の界面混合の影響を最小限に抑えるために、1 回目の滴下は 0.4μl で行います。この 1 回目の滴下のデータ点は、データ解析前に破棄します。

コントロール実験

上記のように、リガンド溶液をシリンジから緩衝液に滴下するので、リガンドの希釈による熱を求めるためにコントロール実験が必要となります。この実験には、滴下プロセス自体と全体として「装置ブランク」と考えられる他のすべての操作上のアーティファクトからの影響も含まれます。もしコントロール実験に対する熱の影響が小さく一定であれば、カーブフィッティングを行う前に、滴下による熱の平均値をサンプル実験の結果から減算して結合パラメータを求めることができます。しかし、対照物質に関する大きな熱作用および滴定が進行するにつれて変化する熱作用は、リガンドとサンプル・緩衝液との間のミスマッチを示している可能性があります（「サンプルの調製時の注意点」セクションを参照してください）。実験を進める前に緩衝液のマッチングをチェックしてください。緩衝液のマッチングを注意深く行ってもコントロール実験結果で認められた傾向を排除できない場合には、シリンジ内でのリガンドの凝集または自己会合が原因である可能性があります。このような場合には、測定条件の見直しが必要になります。

実験温度

他の要因により 25～30℃以外の温度が必要でないかぎり、ITC 実験は 25～30℃（すなわち、室温よりもわずかに高い温度）で実施することが最も便利です。セルはジャケット

との熱交換により受動的に冷却されるので、低温での実験は滴定開始前に、温度平衡のために長い時間を要します。高温（50℃超）ではベースラインでのノイズが大きくなり、データの品質に影響を及ぼします。実験温度の選択に影響を与える他の要因は、結合アフィニティーと、リガンドまたはサンプル分子の安定性および／または溶解度です。一部の溶質、特にタンパク質は、室温超での長時間撹拌に対して不安定であるため、このような場合には低温で作業することが望ましいと考えられます。結合に伴う熱容量変化 ΔC_p を求めるためには、さまざまな温度（例えば 10～40℃）で実験を実施し、結合熱の温度依存性を求めなければなりません。

結合が非常に強い場合（$K_D = 10^{-8}$ M 程度以下）

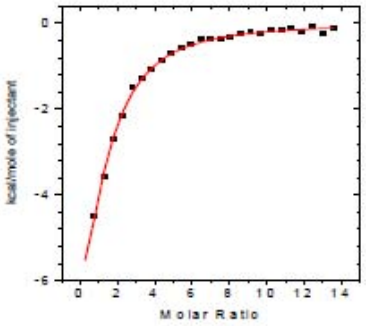
結合が非常に強い場合、C 値を適正な範囲に入れるためには高分子濃度を薄くする必要がありますが、あまりに薄い場合には滴定あたりの熱変化が検出限界以下となり、C 値が適当であっても熱変化をみることができなくなります。1:1 相互作用の場合に確実に測定可能な熱変化を生じさせる最低濃度は、通常約 10 μM です。この場合、得られるパラメータが ΔH と n のみで、正確な K_D が得られない場合があります。このような場合は Displacement ITC 法を用いることで解離定数を求めることが可能です。

結合が非常に弱い場合（$K_D = 10^{-4}$ 程度以上）

結合が非常に弱い場合、C 値を適正な範囲に入れるためには高分子濃度を濃くする必要がありますが、濃度を上げるのが困難な場合、通常と異なり、以下の目安による濃度設定で測定します。

滴定シリンジ側	：	K_D × 10 ～ 50	（1～2 mM）
セル側	：	K_D × 1/5 ～ 1/100	（10 μM 程度以上）

この場合、C 値は 1 以下となりますが、滴定シリンジ側濃度をセル側に対して 50～100 倍の高濃度に設定しますので、下図のようなサーモグラムが得られます。この場合、ΔH と K_D を決定することが可能ですが、n を決定できませんので、値を仮定して解析します。



1:1 の結合で予想 K_D =100 μM の場合

高分子濃度を 10 μM とすると通常の濃度では C = 0.1（熱変化が見られない）となるため、リガンドの濃度を 1 mM 以上の高濃度に設定して滴定することで、熱の変化が観測可能になる。

シミュレーションソフトウェアを用いた実験デザイン

MicroCal iTC_{200} ソフトウェアの *Experimental Design* タブを使用して、アフィニティーおよびサンプル濃度が異なる系の結合曲線をシミュレートすることができます。このツールを使用して、実験デザインを最適化し、所定の実験設定によって品質良好なデータが得られる可能性を評価します。（詳細は P.47, 48.を参照してください）

測定

この MicroCal iTC$_{200}$ 日本語取扱説明書では MicroCal iTC$_{200}$ Test Kit（カタログ番号 KIT-0209-88）を用いた測定を例に取扱説明を行います。

測定概要

1. システムのスタートアップと準備
2. アフィニティーと Ca^{2+}および EDTA 間の相互作用の熱力学パラメータを測定するための実験条件の設定
3. 結果の評価

＊$CaCl_2$ および EDTA の代わりに超純水を使用することができます。相互作用の熱が生じないので、これはシステムの性能を評価するための優れた診断テストとなります。

1. システムのスタートアップと準備

1. 冷蔵庫から MicroCal iTC$_{200}$ Test Kit を取り出し、室温に戻します。
2. PC と装置の左側後方にある MicroCal iTC$_{200}$ のスイッチを入れます。
3. デスクトップ上の *iTC$_{200}$ with Origin* のアイコンをクリックし、測定制御用ソフトウェアを起動します。
4. システムの初期化プロセスの後に、*MicroCal iTC$_{200}$* セットアップ・ソフトウェアが開きます。装置前面の赤いランプが点灯していることを確認してください。
5. 適切な溶液を洗浄ステーション・ボトルに約 75%まで入れてください。Buffer ボトルには、測定時に使用する緩衝液を入れてもかまいませんが、通常超純水をセットしておきます。緩衝液でセルのみを洗浄したいときにその緩衝液を入れます。
6. リファレンスセルへ超純水を充填します。（リファレンスセルは超純水を使用することが多いです）リファレンスセルは毎週、超純水を交換します。超純水は以下の方法に従いリファレンスセルへ充填します。

   a) ガスタイトシリンジをリファレンスセルの底に触れるまでそっと挿入し、セルからすべての溶液を取り除きます。（通常、測定終了後にはセルを超純水で充填してあります）

   b) ガスタイトシリンジに 300 µl の超純水を（室温で）充填します。シリンジを逆さにして軽くたたき、空気を昇らせます。次に、すべての空気がなくなり、液 1 滴が針の先端に現れるまでプランジャーを押圧します。

c) シリンジをリファレンスセルの底に触れるまでそっと挿入した後、底から 1～2 mm 引き上げ、セルに約 200 µl の水をゆっくりと注入します。

d) 20 µl 程度を数回、優しく吸引・注入することで、気泡を取り除きます。その際、空気を引き込まないように注意します。

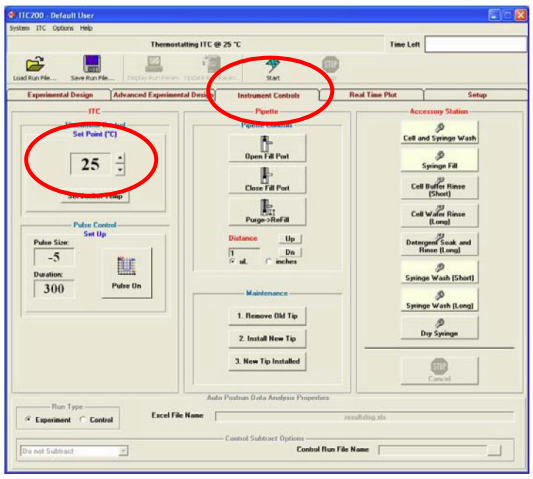
e) 気泡を引き込まないようにして、残りの 100 µl の水をリファレンスセルに注入します。

f) シリンジでかき回すかセルの底を軽くたたいて溶液を撹拌します。

g) シリンジの先端を金属セル・ステム最上部の端まで引き上げ、余分な水を取り除きます。

h) 付属のリファレンスプラグリングでふたをします。

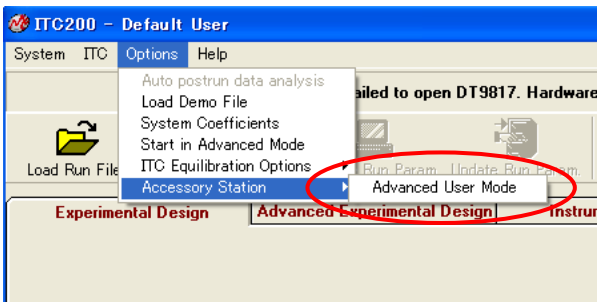
7. *iTC200 Main Window* の *Instrument Controls* タブをクリックし、待機中のジャケットの制御温度を測定温度に設定します。あらかじめ環境温度を安定させ、測定目的温度に設定しておくことが時間短縮のポイントです。（Default の Boot 温度は 30℃に設定されています。）



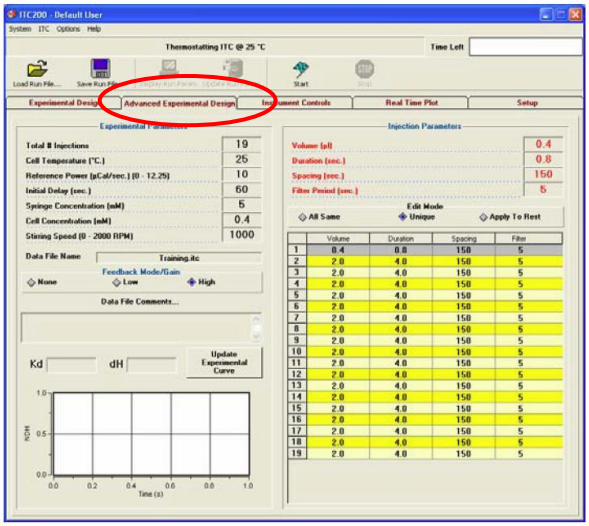
2. Ca^{2+}/EDTA 結合実験

2–1. パラメータ設定

1. *Options の Accessory Station* で、*Advanced User Mode* にチェックが入っていないことを確認し、洗浄および解析設定のための画面上のガイダンスを表示します。

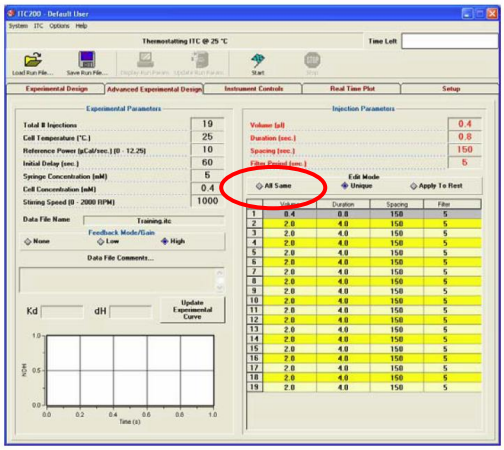


2. *Advanced Experimental Design* タブをクリックします。



3. 1 回目の滴下で時折見られる平衡アーティファクトの影響を最小限に抑えるために 1 回目に少量（0.4 µl）を滴下し、その後は 1 回 2.0 µl、滴下間隔 150 秒で 18 回滴下を行う方法を設定します。1 回目の少量滴下はデータ評価では無視されます。

   Edit Mode を *All Same* に設定し、以下のパラメータを入力します。



Experimental Parameters

Total # Injections	19	滴定の回数
Cell Temperature	25	実験の設定温度（2～80℃）
Reference Power	10	測定中にリファレンスセルにかかる電力 （ベースラインになる）
Initial Delay	60	実験データ取込み開始から最初の滴定までの時間
Syringe Concentration	5	シリンジ中の溶液濃度（mM）
Cell Concentration	0.4	セル中の溶液濃度（mM）
Stirring Speed	1000	シリンジの撹拌速度。通常 1000 rpm

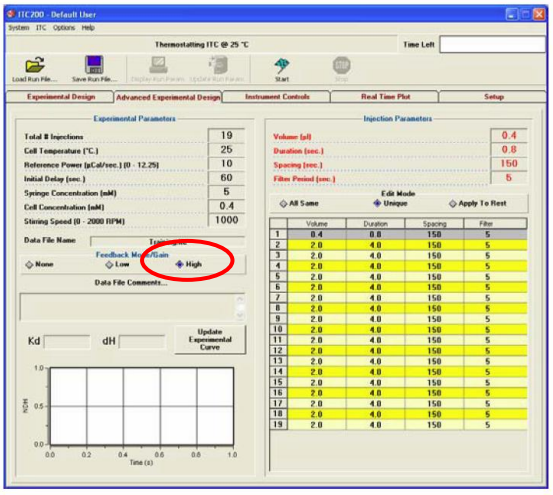
Injection Parameters

Volume	2	滴定 1 回の容量（μl）。通常 0.2～4 μl
Duration	4	滴定の持続時間。*Volume* の 2 倍数に自動で設定
Spacing	150	滴定の間隔時間。一般的な実験の場合 60～120 sec 程度。ピークがベースラインに戻るまでの時間を設定。
Filter Period	5	データの取込み時間間隔。通常 5 sec。

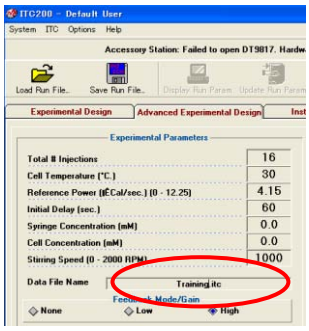
【参考】*Spacing* の時間設定について

実際の測定では、ピークがベースラインに戻る前に次の滴定が始まると正確な熱量を測定することができません。ピークが設定時間内にベースラインに戻らないようであれば、Spacing の設定パラメータを変更する必要があります。変更方法については P.29. 2-5. 測定中の滴定パラメータの変更方法を参照してください。

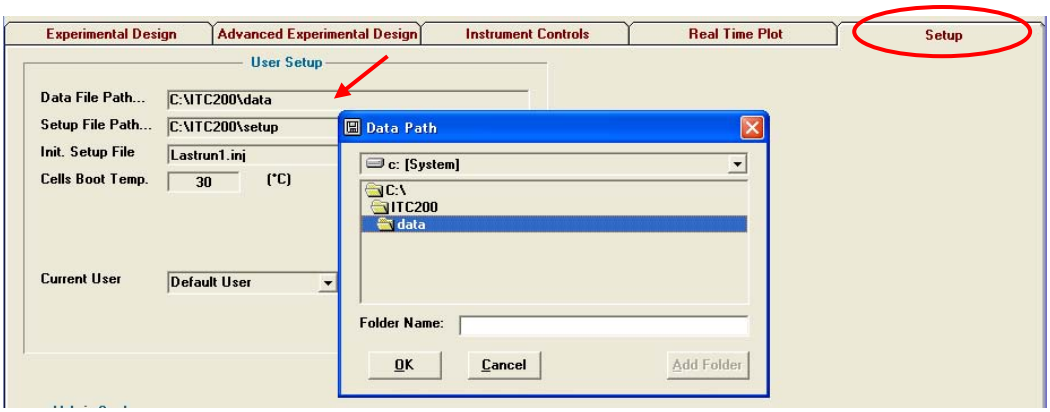
4. *Feedback Mode/Gain* を *High* に設定します。（*Feedback Mode/Gain* は DP（補償エネルギーの応答速度の設定です。通常は、*High* を使用します。反応速度の遅い系や、構造の経時変化を測定する場合は、*Low* もしくは *None* を使用します。）



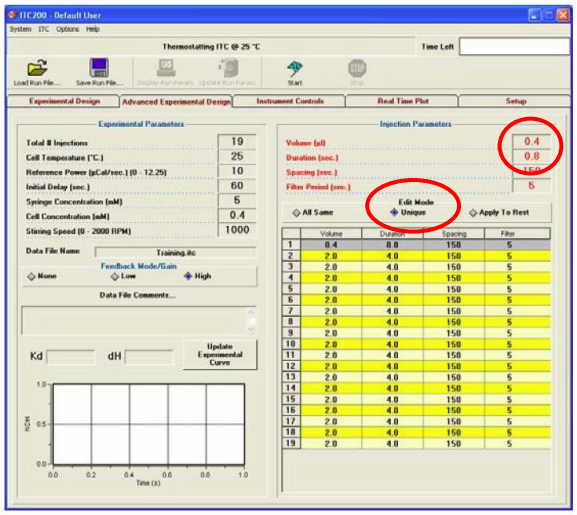
5. *Data File Name* 欄に結果のファイル名（例：Training.itc）を入力します。



データは *Setup* タブの *Data File Path* で指定したフォルダへ保存されます。（デフォルトは C:/ITC200/data）変更したい場合は、*Data File Path*...の指定欄をダブルクリックし、フォルダを指定します。



6. 1 回目の滴下パラメータを変更します：右側の表の 1 を選択し（青くなります）、*Edit Mode* の *Unique* をクリックします。次に *Injection Parameters* の設定で *Volume* を 0.4、*Duration* を 0.8 に変更します。



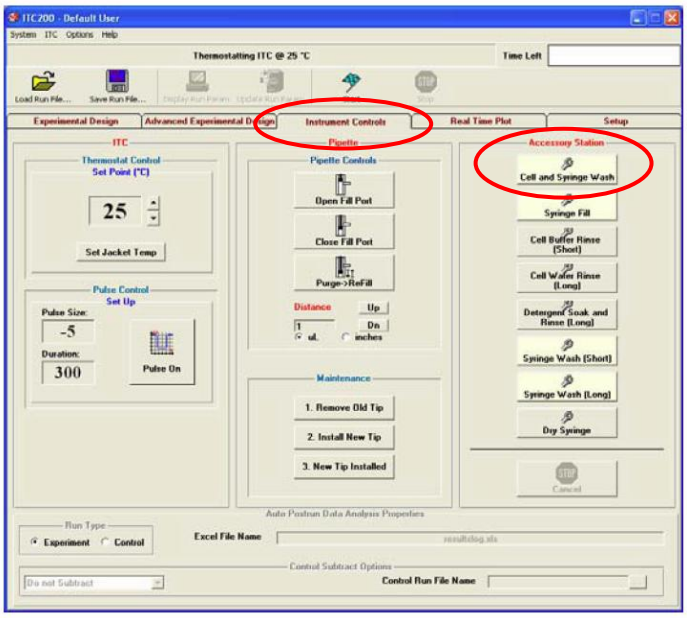
2–2. 測定前の洗浄作業

1. 洗浄モジュールのチューブ配置を確認してください（図 3）。また、作業は必ず 30℃以下で実施してください。（温度設定は P.17.を参照してください） 以下の作業は、測定が終了したときにも必ず実施してください。

A) C1 はフィルポート・アダプター保管位置に（右側）
B) C2 は洗浄ポートに（右側）
C) C3 は洗浄ツールの最上部に（左側）
D) C4 は洗浄ツールの側部に（左側）
E) C5 は廃液に（左側）

図 3. 洗浄モジュールにおけるチューブの接続

2. *Instrument Controls* タブを選択し、*Accessory Station* パネルの *Cell and Syringe Wash* ボタンをクリックします。

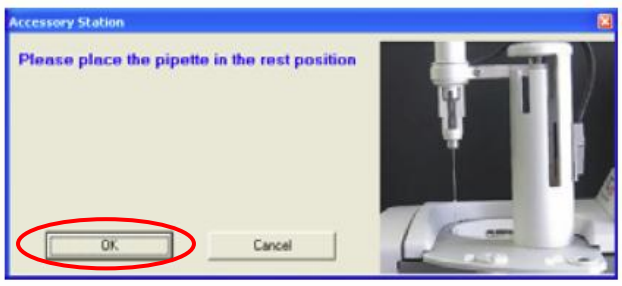


3. 洗浄手順について、画面の指示に順次従ってください。

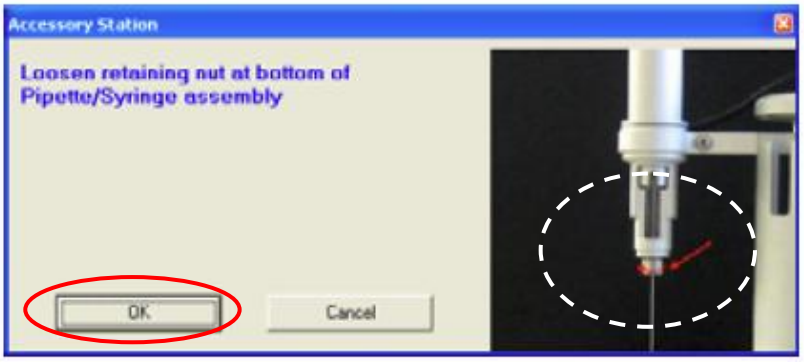
a) 予めセルからサンプル（または超純水）をガスタイトシリンジで取り出します。

b) 洗浄ツールをセルにセットし、*OK* をクリックします。Buffer ボトルから溶液（超純水でも可）を 3 ml 流します。終了後、画面上に以下の表示が出たら、洗浄ツールを保管位置に戻します。

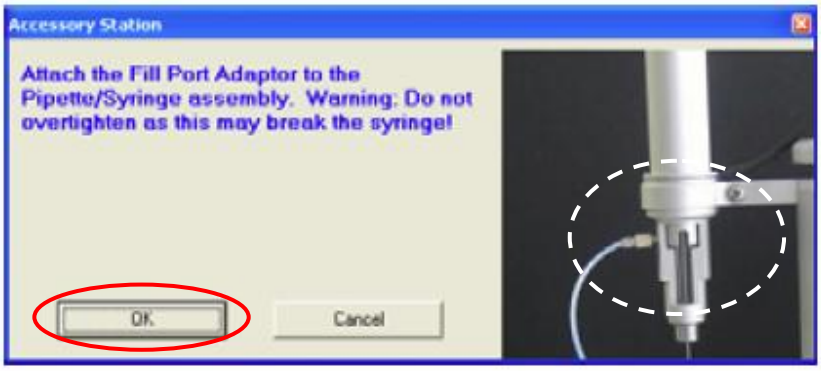
c) ピペットをレストポジションにセットします。*OK* をクリックします。



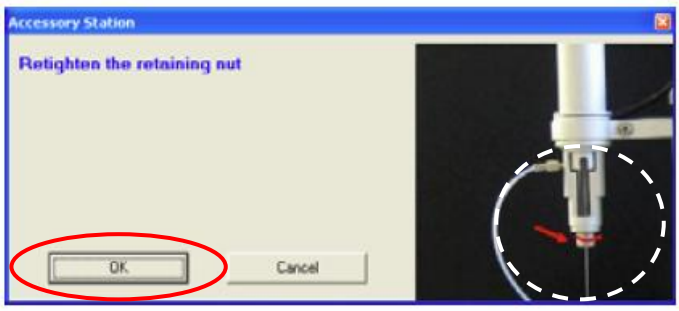
d) 内部シリンジ・ホルダーを押さえながらピペット下部の止めナットを時計回りに半回転させて緩めます。OK をクリックします。 このステップはピペットを破損させないために非常に重要な作業です。



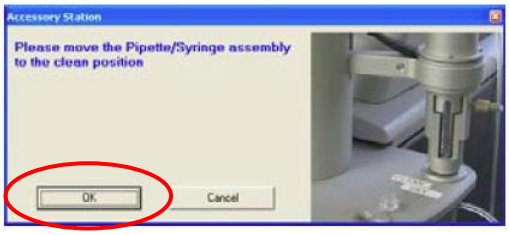
e) フィルポート・アダプターをピペットに装着します。その際、強くしめすぎないようにします。シリンジを回転させ、ピペットの外部ケーシングと内部シリンジ・ホルダーのそれぞれの穴を合わせます。 OK をクリックします。フィルポート・アダプターを傾いた状態で差し込むと溶液をうまく吸えなかったり、乾燥後にメタノールがシリンジ内に残る原因となりますのでご注意ください。



f) 必ず、止めナットを反時計回りに軽く回して締め直してください。OK をクリックします。



g) ピペットをウォッシュポジションに移動し *OK* をクリックします。ピペットの洗浄が始まります。



4. 洗浄が行われている間に、$CaCl_2$ 溶液 100 µl が入ったマイクロ遠心チューブをチューブ・ホルダーにセットします。チューブの底に気泡がないことを確認してください。チューブをホルダーの底部まで確実に押し込み、フタを備え付けの溝にはめ込みます（図 4 参照）。チューブのどの部分もシリンジ針の通り道に残らないように注意します。

図 4. ホルダーの所定の位置にセットされたサンプル・チューブ。サンプル・チューブのフタはホルダーの溝（←）に合わせます。

【注意】メタノール送液用チューブについて

長時間装置を使用していないと、滴定シリンジにメタノールを送液するためのチューブ内が乾燥することがあります。そのままの状態で測定を行おうとすると、滴定シリンジ内が乾燥せず、滴定濃度に影響が出る場合があります。使用期間が開いた場合、チューブにメタノールが充填してあるかをご確認ください。乾燥している場合は、*Instrument Controls* タブ内の *Accessory Station* パネル中の *Syringe Wash(Long)*ボタンをクリックしてメタノールを充填します。完全にチューブがメタノールで充填されるまでこの操作を続けますが、乾燥のステップは省略することができます。省略する場合は、画面右下にあるキャンセルボタンを押してください。

2–3. サンプルのセットと測定

1. サンプルセルを、以下の手順で 10 mM MES 緩衝液および EDTA 溶液を用いてすすぎます（図 5）。

   a) ガスタイトシリンジ針をサンプルセルの底に触れるまでそっと挿入し、セルからすべての残液を取り除きます。

   b) ガスタイトシリンジに 350 µl の緩衝液（10 mM MES）を充填します。シリンジ針をサンプルセルの底に触れるまでそっと挿入した後、底から 1～2 mm 引き上げ、ゆっくりとセルに緩衝液を注入します（約 250 µl）。50 µl のバッファーを吸引・注入することでセルを優しく洗浄し、セルの内容物を混合します。

   c) セルからできるだけ緩衝液を取り除きます。

   d) サンプル溶液（EDTA）を用いて上記の手順を繰り返します。すすぎ手順はサンプルが貴重な場合には省くこともできますが、セルをサンプル溶液ですすぐことで結果が改善されることが分かっています。

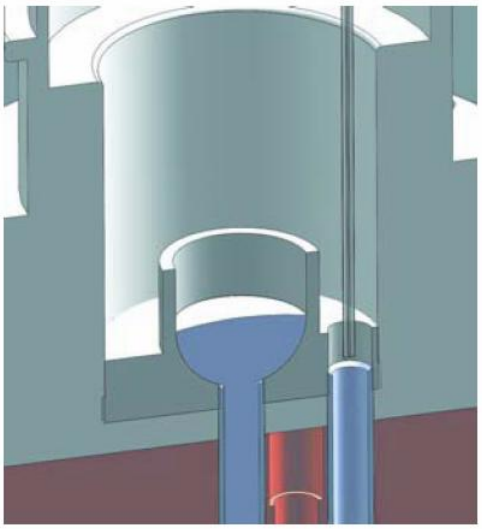


図 5. 装置の前面から見た滴下ウェルの断面。サンプルセル（左）とリファレンスセル（右）の滴下ポートを示しています。イラストはリファレンスセル・ポート内のガスタイトシリンジ針を示しています。

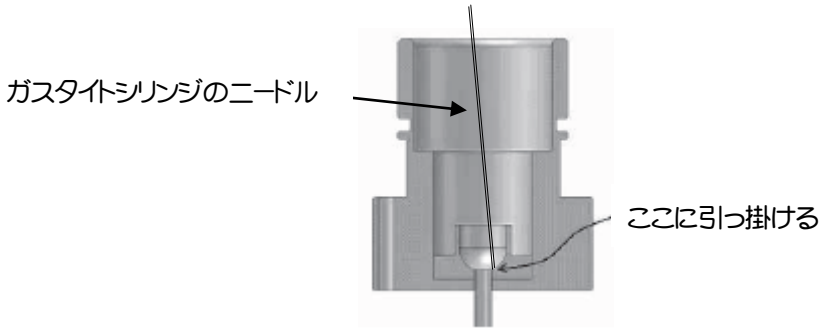
2. サンプルセルに EDTA 溶液を充填します。

   a) ガスタイトシリンジに EDTA 溶液を 350 µl（室温で）充填します。シリンジを逆さにして軽くたたき、すべての空気がなくなり、1 滴が針の先端に現れるまでプランジャーを押します。

b) シリンジ針をサンプルセルの底に触れるまでそっと挿入した後、底から 1～2 mm 引き上げ、セルに緩衝液を、セル・ステムの最上部からあふれるまでゆっくりと注入します。50 µl を数回、優しく吸引・注入することで気泡を取り除きます。その際、空気を引き込まないように注意します。

c) シリンジでかき回すかセルの底を軽くたたいて溶液を撹拌します。

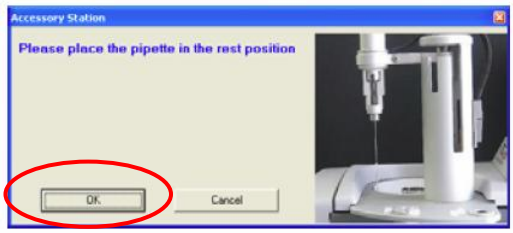
d) シリンジの先端を金属セル・ステム最上部の端まで引き上げます。段差がありますので、その外側にシリンジ先端をひっかけて余分な溶液を取り除きます。



3. リファレンスセルは P.16. – 17.に従って準備します。

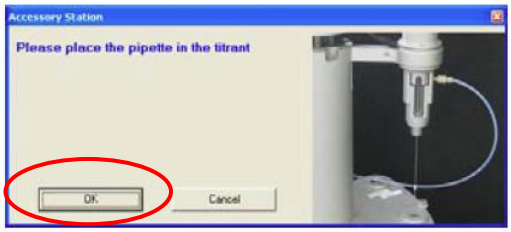
4. 洗浄が終わったら、*Accessory Station* パネルの *Syringe Fill* ボタンをクリックし、画面の指示に順次従って、シリンジに $CaCl_2$ 溶液を充填します。

a) ピペットをレストポジション（ユーザー側にある浅い溝）にセットします。*OK* をクリックします。

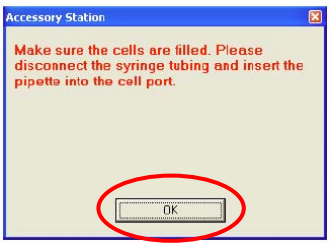


b) フィルポート・アダプターをピペットに装着するように指示がでます。この作業は洗浄手順中に終わっているので、*OK* をクリックしてこのステップをとばします。

c) 次の指示が出たら、ピペットを $CaCl_2$ 溶液（滴定剤）の入ったマイクロ遠心チューブに入れ、*OK* をクリックします。



d) シリンジの充填が完了したら、フィルポート・アダプターを外します（以下のダイアログ・ボックスが表示されます）。フィルポート・アダプターをフィルポート・アダプター保管位置に戻し、ピペットをセル・ポートに挿入します。*OK* をクリックします。

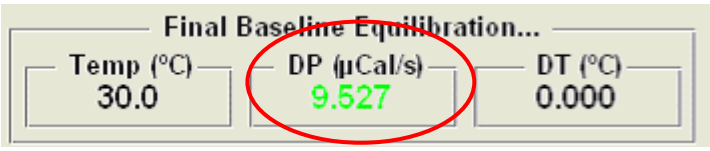


5. *Start* をクリックして測定を開始します。しばらくすると DP 信号（赤で表示）が 9 µcals/sec を超えた値で安定するはずです。この値よりも低い場合は、セルを EDTA 溶液で再充填します。実行時間は約 1 時間です。

2–4. ベースライン安定の目安（*Options* の設定）

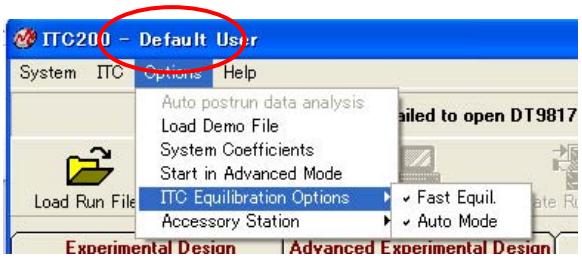
正確な熱量を求めるためにはできるかぎりベースラインが横軸に対して水平になるまで安定化するのを待つことをおすすめします。初期設定では、ソフトウェアがベースラインの安定化を判断し、実際の測定を行うようにセットされています。この安定化の判断は、かなりスロープがある状態でも DP が緑に変わり、安定化したと判断します。できることならば、測定者により視覚的判断をしていただくことをおすすめいたします。無撹拌時、撹拌時の 2 回の安定化判断がありますが、通常、撹拌時のベースラインの安定化を判断します。

測定者が判断して測定を行うときは、*Real Time Plot* タブの画面左上にある *DP* ボタンをダブルクリックします。



ベースライン安定化のオプション設定は以下のように行います。

1. *Options* の *ITC Equilibration Options* を選びます。

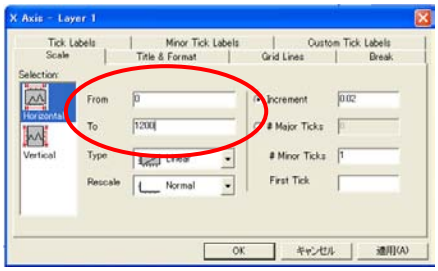


2. *Fast Equil.*は撹拌しないで安定化を行うフェーズをスキップするコマンドですので、チェックが入っていることを確認します。

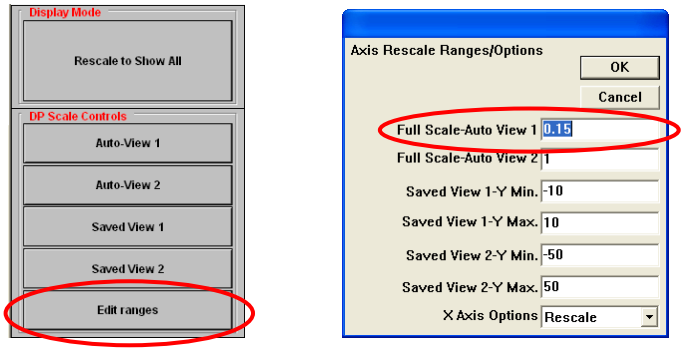
3. *Auto Mode* は安定化の判断をソフトウェアにより自動で行う場合にチェックを入れます。

4. 安定化の確認をオートで行う場合もそうでない場合も、*Origin 7 Software* のプロットスケールを以下のように設定して DP シグナルの確認を行います。
   ベースラインのドリフトやノイズの大きさは、*ITC200* ウィンドウの *Real Time Plot* タブでも確認できますが、観察時のプロットスケールを以下のように、毎回同じ値に設定することをおすすめします。

   横軸 ： 横軸をダブルクリックすると *X Axis-Layer 1* ウィンドウが立ち上がります。
   From に「0」、*To* に「1200」と入力します。



   縦軸 ： 画面左下に表示されている *DP Scale Controls* の *Edit ranges* をクリックすると *Axis Rescale Ranges/Options* ウィンドウが立ち上がります。*Full Scale-Auto View 1* に 0.15 と入力し、OK をクリックします。



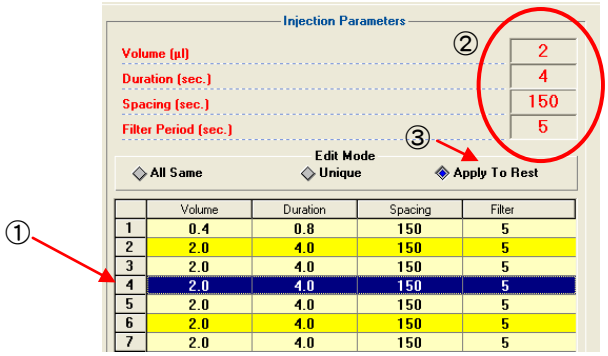
DP Scale Controls の *Auto-View 1* をクリックします。

2–5. 測定中の滴定パラメータの変更方法

1. 測定中に *Injection Parameters* を変更したい場合、テーブルで変更したいインジェクションナンバーを選択します。(行が青色に変わります)

2. *Edit Mode* の *Apply To Rest* を選びます。

3. 上段の入力用カラム中の数値を変更します。



4. *Update Run Parameter* をクリックし、変更を確定します。

2–6. コントロール実験

コントロール実験として、サンプルセル内の EDTA 溶液の代わりに MES 緩衝液を使用し、すべての実験手順を繰り返します。リガンド溶液として同一の $CaCl_2$ 濃度（0.4 mM）を滴定します。

結合はしませんが、$CaCl_2$ の希釈熱とこの条件での装置ブランクを示す熱が少量発生します。これらは、データをフィッティングする前に滴定実験の結果から差し引きされます。

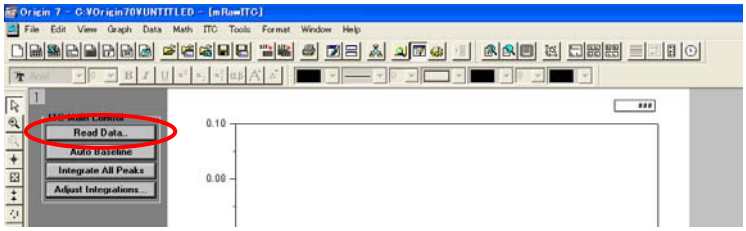
2–7. データ解析

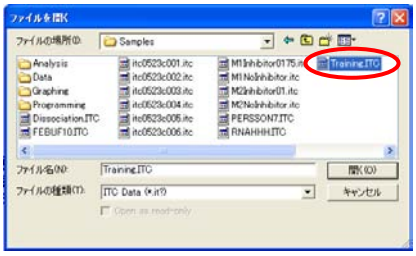
ここでは、EDTA - $CaCl_2$ 結合実験で得られたデータを例に ITC データの解析方法を説明します。

2–7–1. 測定データの読み込み

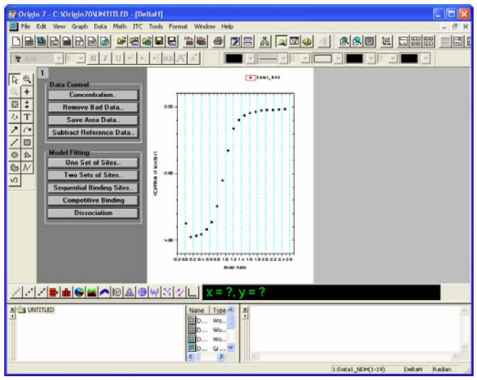
1. Origin iTC_{200} ソフトウェアを開きます。

2. *Read Data* をクリックして、目的の滴定実験データファイルを開きます。

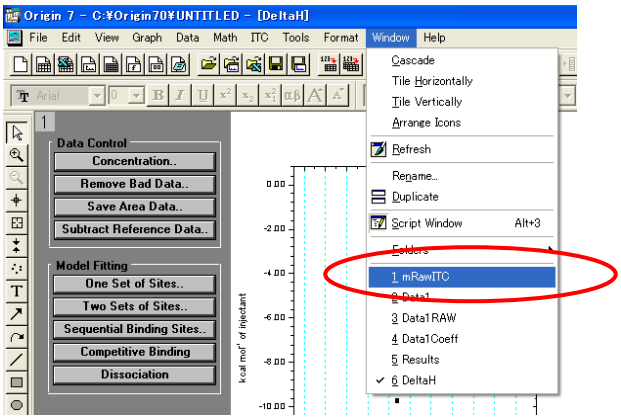




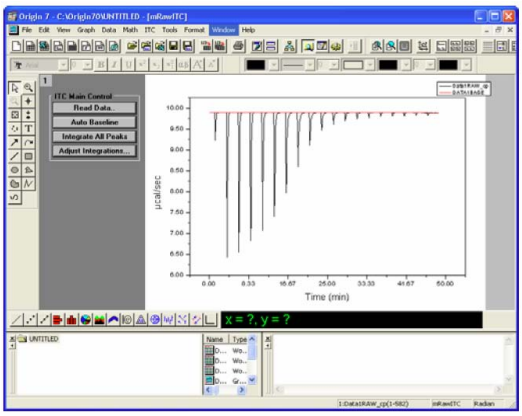
3. ソフトウェアが自動的に各ピークの面積を計算し、以下に示すように、これらの値をモル比（リガンドモル濃度/高分子モル濃度）に対してプロットします。データが大幅に分散している場合には、再実験を行う必要があります。信頼性の低いデータが生じる最も一般的な原因は、サンプルセルの汚れかセル内の気泡の混入です。メンテナンス手順に従い、セル充填手順を順守することによって、信頼性の低いデータの発生のリスクは低下します。



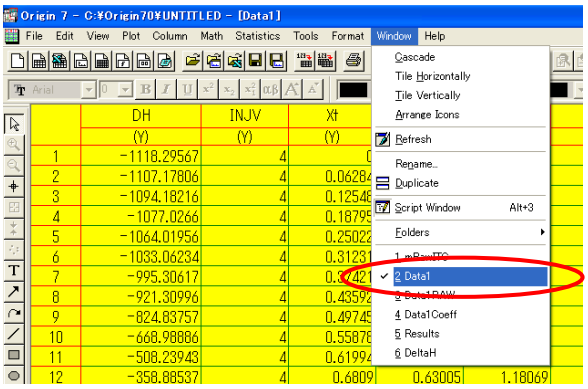
4. データをグラフ表示するためには、*Window* から *mRawITC* を選択します。



赤線が自動的に作成され、ピーク積分のベースラインとして設定されます。このようにして計算された各滴下による熱を用いて、上記のステップ 3 で示したような、濃度でノーマライズしたデータが作成されます。必要に応じてベースラインを手動で調整することができます。（P.42.～P.46.を参照してください）



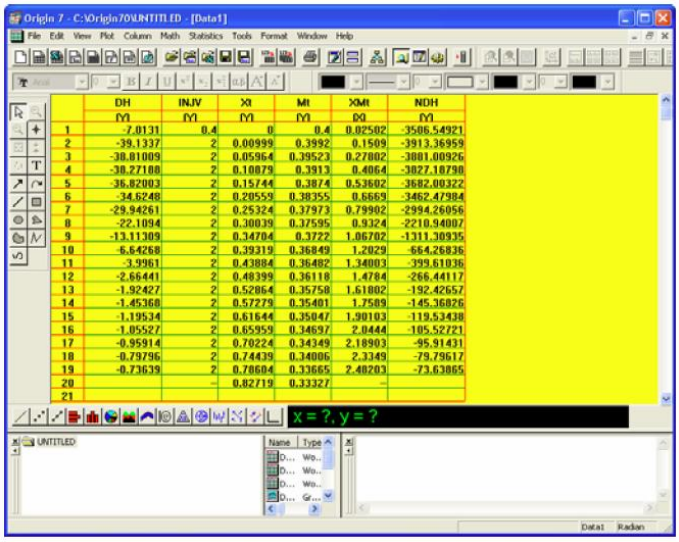
5. データを数値形式で表示するためには、*Window* から *Data1* を選択します。



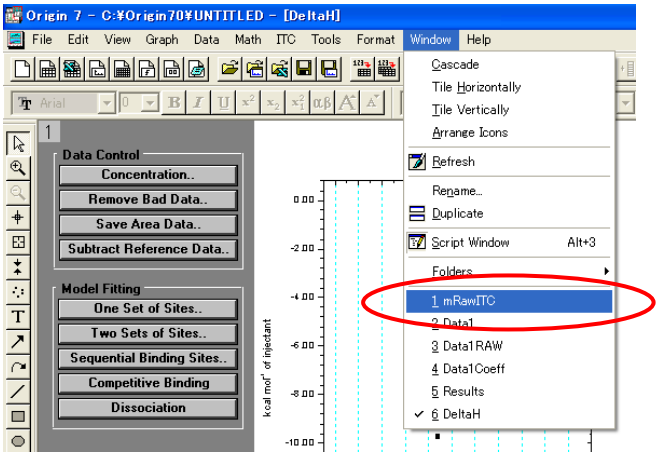
表にはデータ解析に必要なすべての情報が含まれています。この時点でこれらの数値を使って解析することはありませんが、データのチェックをすることにより一部のトラブルシューティングに役立つことがあります。

1 列目の数値（DH）は、各滴下による熱量を単位 µcals で表しています。通常、1 回目の滴下による熱量は、滴下前のセル内およびピペット内での液体の界面混合によって、期待値よりも低くなります。一般的に、2 回目の滴下による熱量の最低値は、2 µcals/sec よりも大きくなります。熱がそれよりも小さい場合には、測定をやり直し、セル内とシリンジ内の物質の濃度を上昇させることが有効な場合があります。

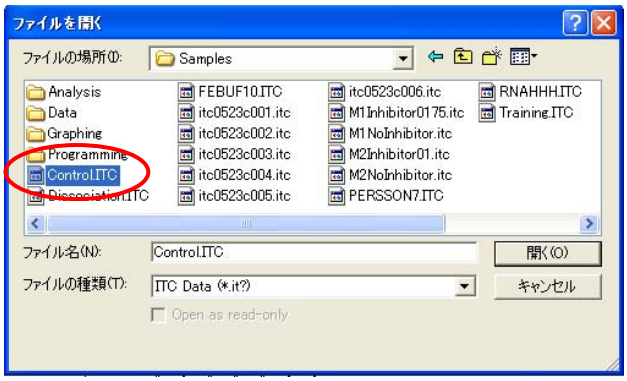
2 列目の数値（INJV）は滴下量を表しています。Xt および Mt はそれぞれ、滴下前のセル内のリガンドおよび物質の濃度を表しています。XMt は滴下後のセル内の物質濃度の比を表しており、NDH は滴下による熱を 1 モル当たりの Xt でノーマライズした値を表しています。



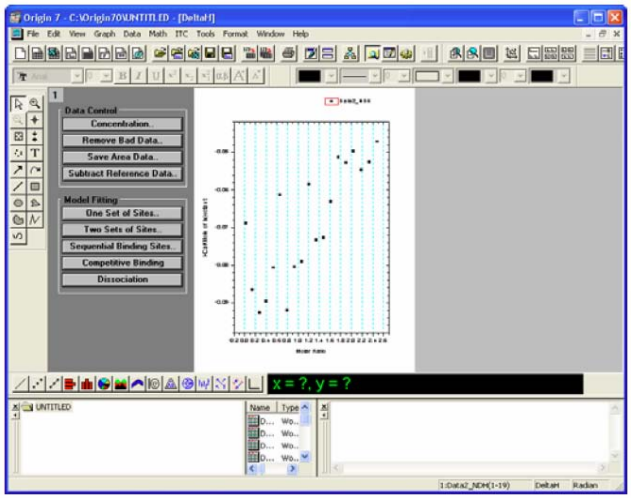
6. コントロール実験データファイルを呼び出します。*Window から mRawITC* を選択します。



Read Data をクリックしてコントロール実験データファイルを開きます。

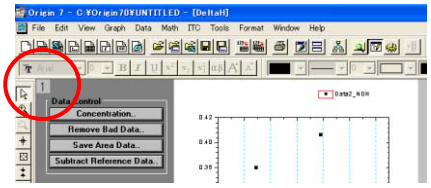


ソフトウェアはベースラインを自動で作成し、各ピークを積分して、濃度によりノーマライズしたデータを表示します。



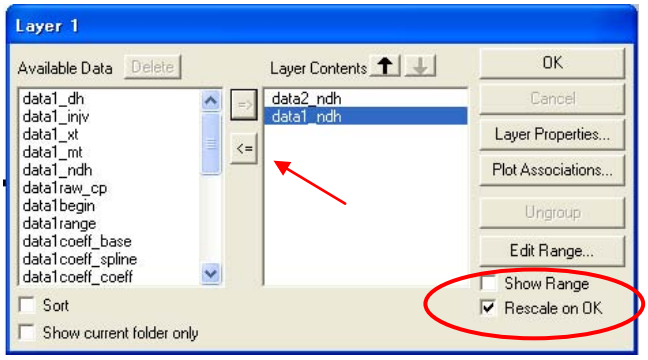
2–7–2. 画面上に 2 つのデータを表示

表示ページの左上隅の *1* をダブルクリックすることにより 2 つのデータセットを一緒に表示できます。

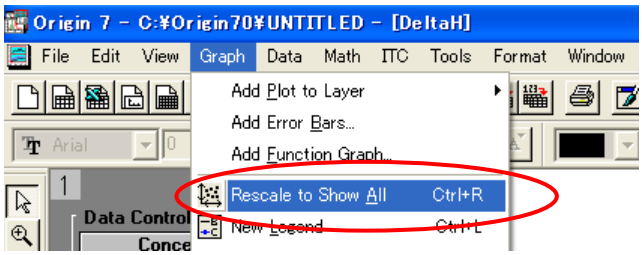


Available Data と *Layer Contents* という 2 つの欄があるダイアログ・ボックスが表示されます。利用可能データは、前述した *Data1* ワークシート欄の数値です。拡張子が ndh のファイル（ここでは *data1_ndh*）を選択し、*Layer Contents* ボックスを指す矢印（←）をクリックして、濃度によりノーマライズされたデータをプロットします。

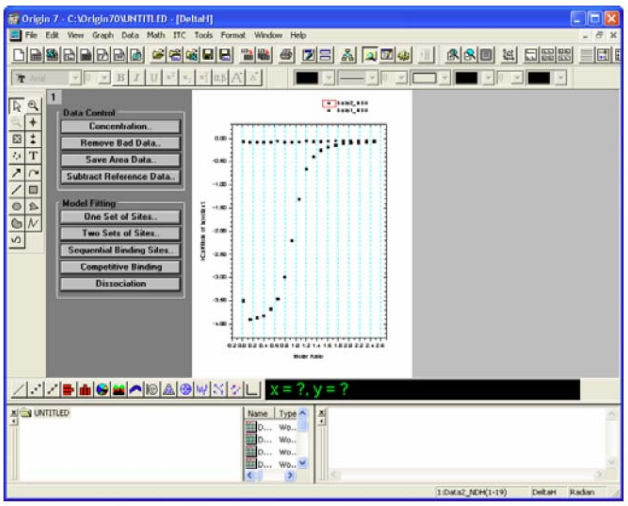
両方のデータセットを適切なスケールで表示するには、*Rescale on OK* にチェックを入れます。



Rescale on OK のチェックを忘れた場合は、*Graph* から *Rescale to Show All* を選ぶと適切なスケールで表示されます。

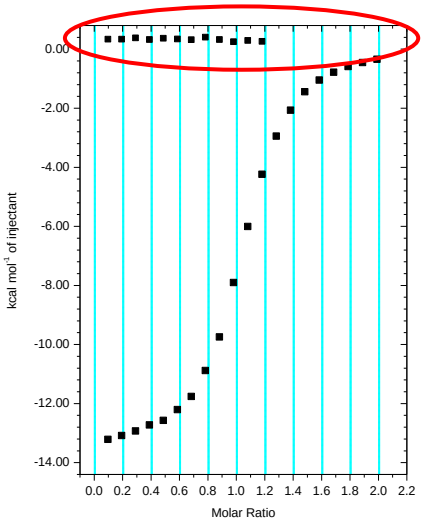

Origin 7 - C:¥Origin70¥UNTITLED - [DeltaH]
File Edit View Graph Data Math ITC Tools Format Window
Add Plot to Layer
Add Error Bars...
Add Function Graph...
Rescale to Show All Ctrl+R
New Legend Ctrl+L
Data Control

重ねたデータは以下のように表示されます。

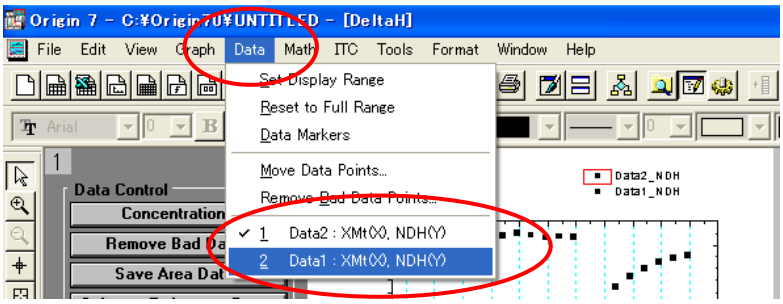


【参考】サンプルデータとコントロールデータの横軸がそろわない場合

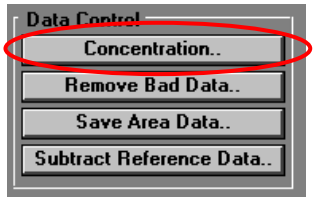
コントロール測定条件設定時にセル濃度を0にすると以下のようなデータが得られることがあります。コントロールデータの濃度情報を変更することで横軸をそろえることができます。

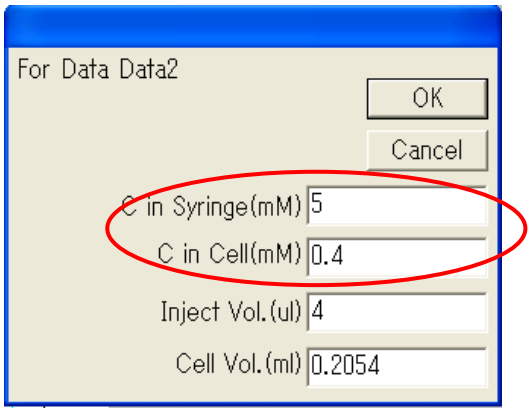


a) *Data* から濃度情報を変更するデータを選択します。チェックマークが付いている方がアクティブになっているデータです。(図では 1 Data2)

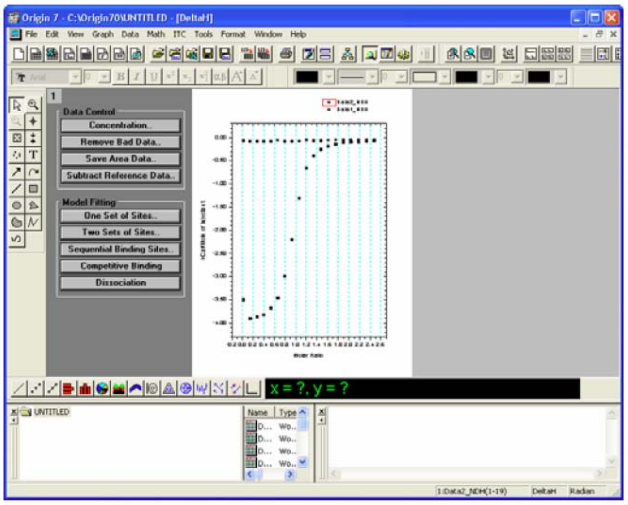


b) *Concentration..*をクリックすると以下のウィンドウが開きます。この時のコントロールデータは、セルは緩衝液のみのため実際の濃度は 0 ですが、表示をそろえるためにサンプルデータと同じ濃度を入力します。*Inject Vol.*および *Cell Vol.*は変更をする必要はありません。





c)　濃度でノーマライズされたコントロールデータが得られ、横軸がそろいます。



2-7-3. コントロールの差し引き

サンプルデータからコントロールデータの希釈熱を差し引きします。

コントロールの差し引きの方法は 2 種類あります。

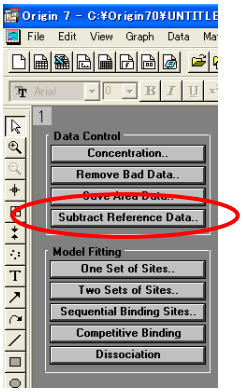
1)　生データを差し引く方法

2)　平均値を差し引く方法

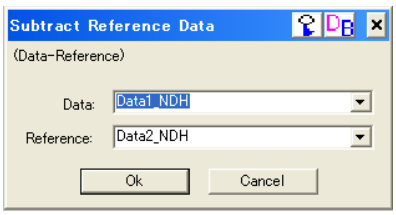
最も正確なコントロールの差し引き方法は 1)を用いることですが、各滴定ピークの値が小さく、一定の値を呈しているときは 2)を用いても問題ありません。状況に合わせて選択してください。

1)　生データを差し引く方法

a)　*Subtract Reference Data* をクリックします。

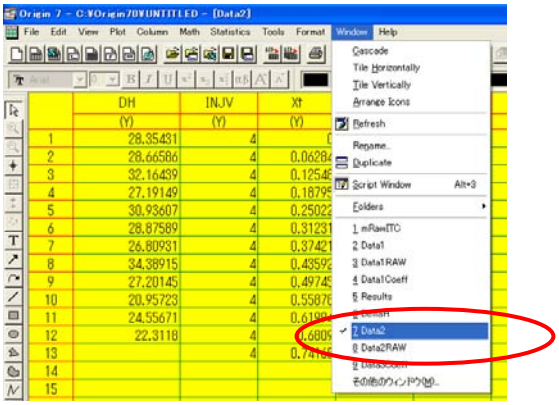


b)　以下のウィンドウが表示されます。*Data:*にサンプルデータを、*Reference:*にコントロールデータを選択し、*OK* をクリックします。

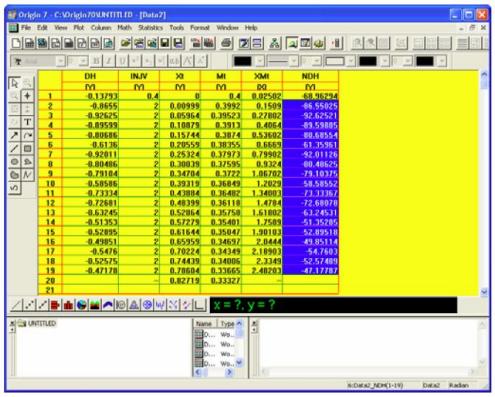


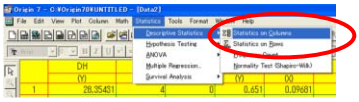
2) 平均値を差し引く方法

a) *Window* から *Data2* を選択します。

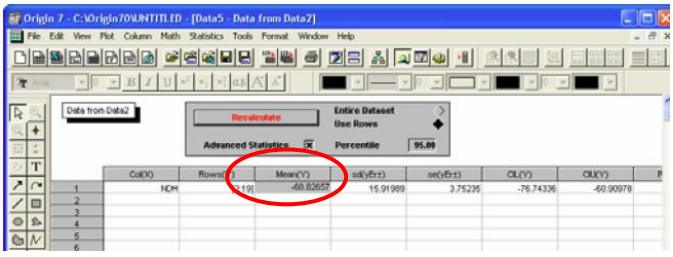


1 回目の滴下を除いて *NDH* 列の値をドラッグして反転表示させます。*Statistics* から *Descriptive Statistics* を選択し、次に *Statistics on Columns* を選択します。

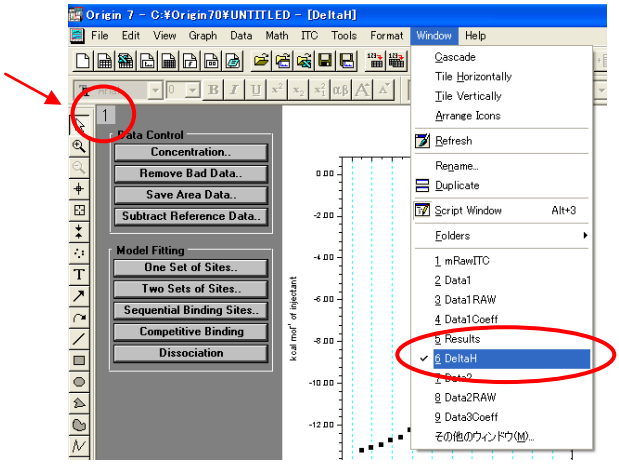




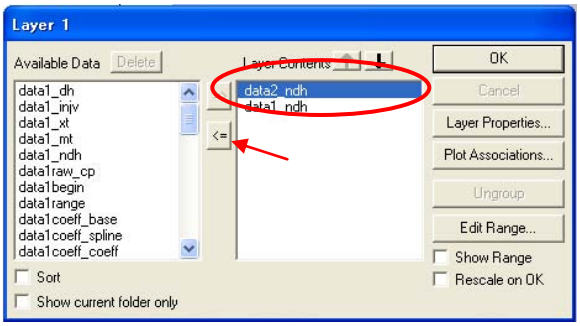
b) 基本的な統計情報の一部が以下のような表で示されます。3 列目に示されたコントロールの熱に対する *Mean(Y)*の値をメモしておいてください。この値は、リガンド希釈熱および装置ブランクを表しており、後でユーザーのデータセットから差し引きします。



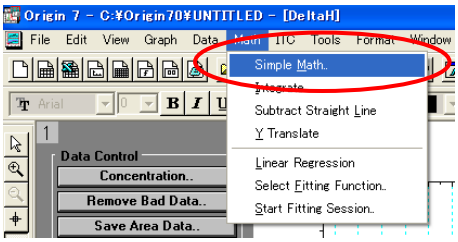
c) *Window* から *DeltaH* を選択します。



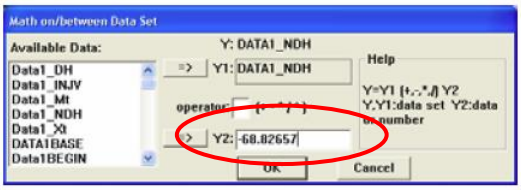
表示ページの左上隅の *1* をダブルクリックし（→）、*Layer Contents* 欄の *data2_ndh* を選択して、プロットからコントロール実験のデータを除きます。データを除くためには欄の間の左矢印（←）をクリックします。*OK* をクリックして、プロットからコントロール・データセットを除きます。



3) *Math* から *Simple Math* を選択します。

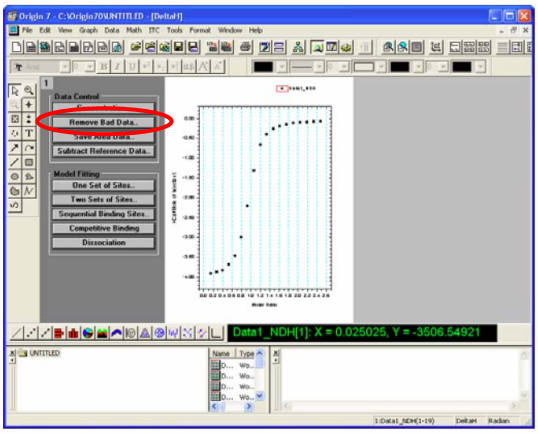


マイナス(-)を *operator* の空欄に入力し、ステップ 3 で求めたコントロールの熱の平均値を *Y2* ボックスに入力し *OK* をクリックします。



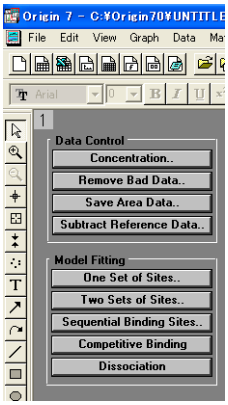
2–7–4. バッドデータの削除

1 回目の滴下を除くために、*Remove Bad Data* ボタンをクリックし、十字線を最初の点に合わせ、ダブルクリックしてデータ点を取り除きます。



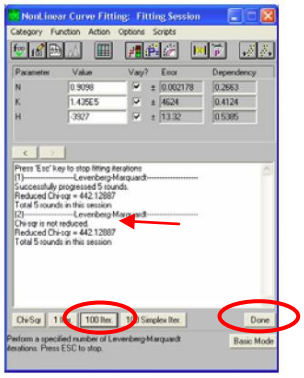
2–7–5. データフィッティング

1. *One Set of Sites* ボタンをクリックしてデータをフィッティングします。（モデルについては P.41.　2-７-6 フィッティングモデルをご参照ください）

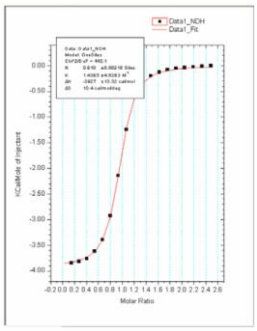


これにより、フィッティング・セッションのダイアログ・ボックスが開き、最初のフィッティングとストイキオメトリー（*N*）、結合定数（*K*）およびエンタルピー変化（*H*）の値が表示されます。

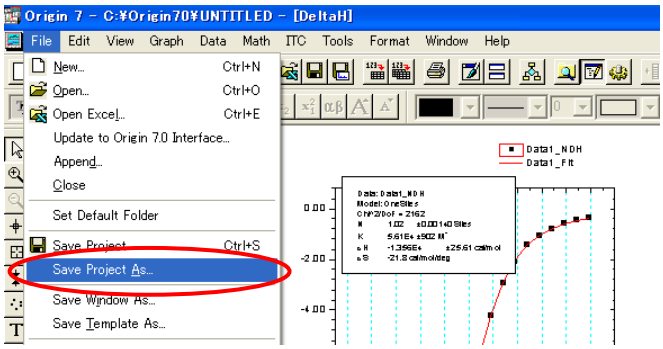
2. *100 Iter* ボタンをクリックしてフィッティングを開始します。*Reduced Chi-sqr* 値（←）が「Chi-sqr is not reduced.」と表示されるまでこれを繰り返します。*Done* をクリックしてフィッティングを終了します。



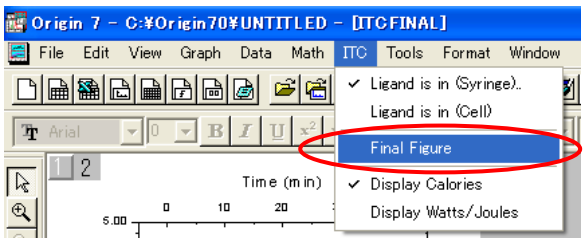
3. フィッティングに基づいた N、K（K_A）、ΔH および ΔS の値がプロットの隣に表示されます。



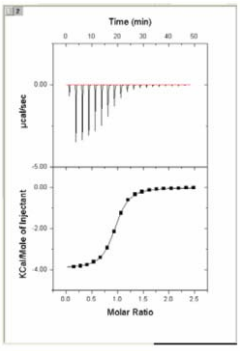
4. *File* から *Save project as* を選択し、フィッティングした結果を保存します。



5. *ITC* をクリックし、*Final Figure* を選択することによって、ベースライン補正生データおよびフィッティングしたデータを一緒に示す最終的な図を作成することができます。



これらの図をコピーするには、*Edit* から *Copy Page* コマンドを使用します。



【参考】
File から *Export Page*...を選ぶと、ファイルの種類を変えて（PDF、TIF など）Final Figure を保存することができます。

2-7-6. フィッティングモデル

Origin にはあらかじめ 5 つの相互作用モデルが用意されています。

1. **One Set of Sites**
   結合サイトが 1 種類だけの場合のモデルです。結合サイトが複数あってもすべて同じ結合様式の結合サイトである場合はこのモデルを使用します。

2. **Two Set of Sites**
   結合サイトが 2 種類で、互いに独立したサイトである場合のモデルです。

3. **Sequential Binding**
   結合サイトが 2 種類以上であり、互いに協同作用がある場合の解析に使用します。

4. **Competitive Binding**
   Displacement ITC 法で測定したデータを解析するときに使用します。

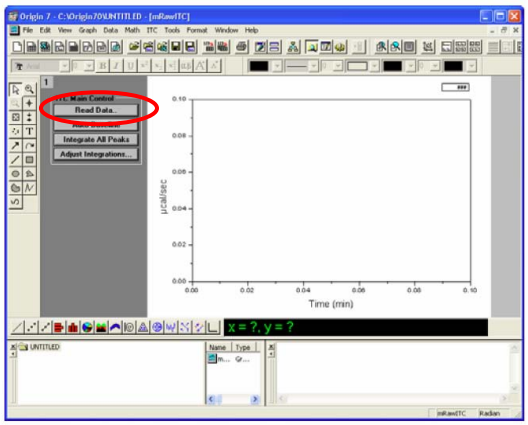
5. **Dissociation**
   会合体解離モデルの解析に使用します。

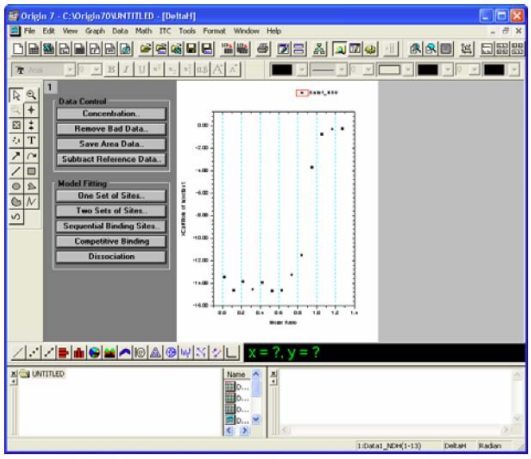
2–7–7. ベースライン、積分範囲の再計算

通常、生データの積分範囲は自動的にベースラインが作成されて計算されます。もし、ベースラインを補正後、積分範囲を指定して再計算したい場合には、以下の操作を繰り返し行います。

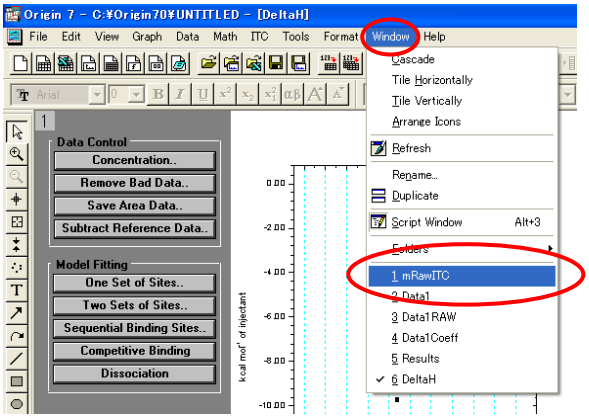
1. Origin iTC$_{200}$ ソフトウェアを開きます。

2. *Read Data* をクリックして目的のデータファイルを開きます。

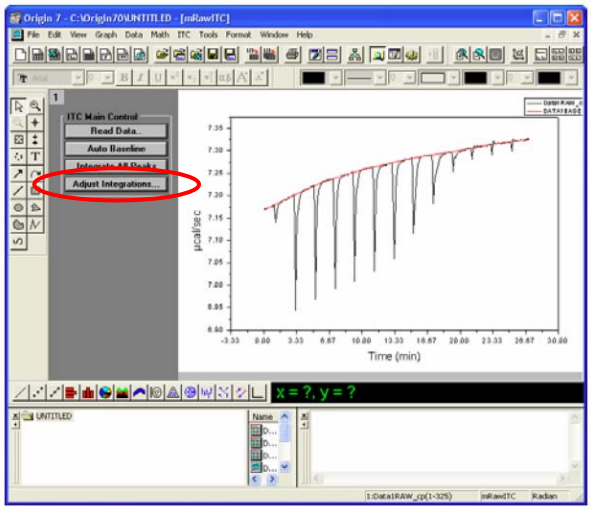




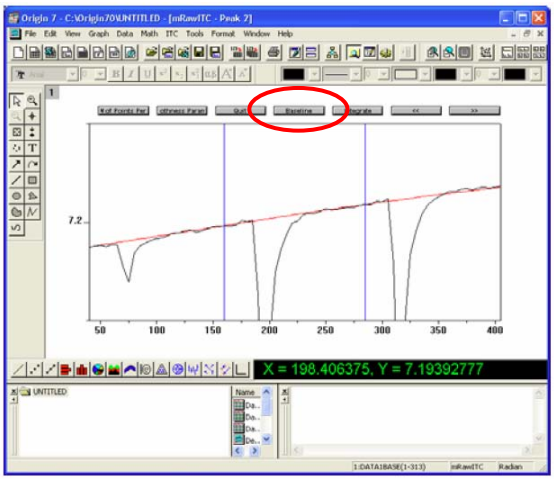
3. *Window* から *mRawITC* を選択します。

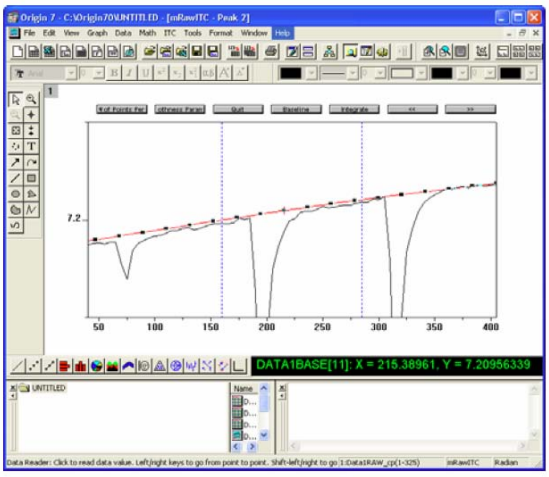


赤線が自動的に作成され、ピーク積分のベースラインとして設定されます。*Adjust Integrations* をクリックします。

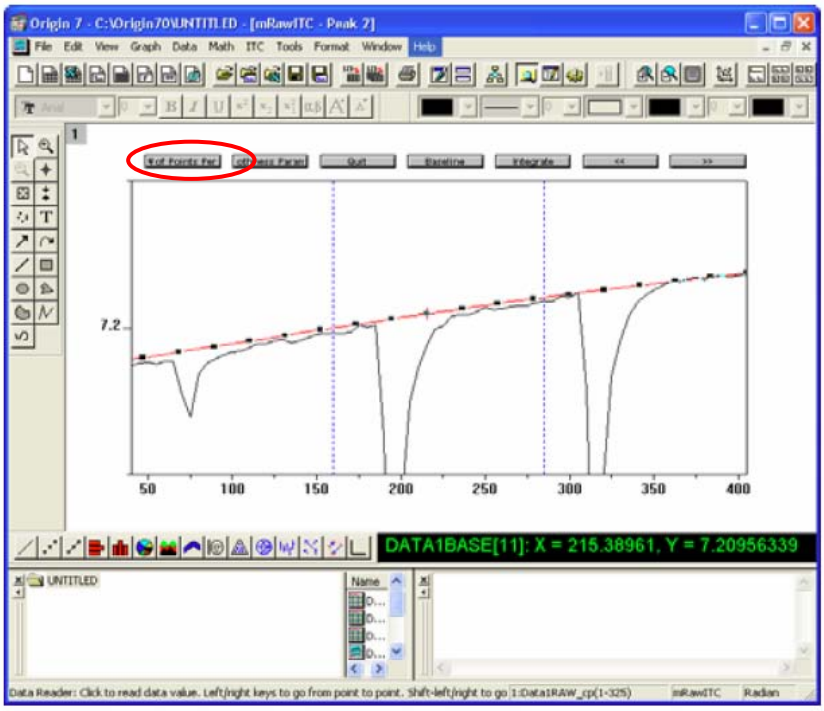


4. 2 番目のピークに十字線を合わせ、マウスの左ボタンをクリックすると以下のように表示されます。 *Baseline* をクリックして、ベースラインの操作機能をアクティブにします。

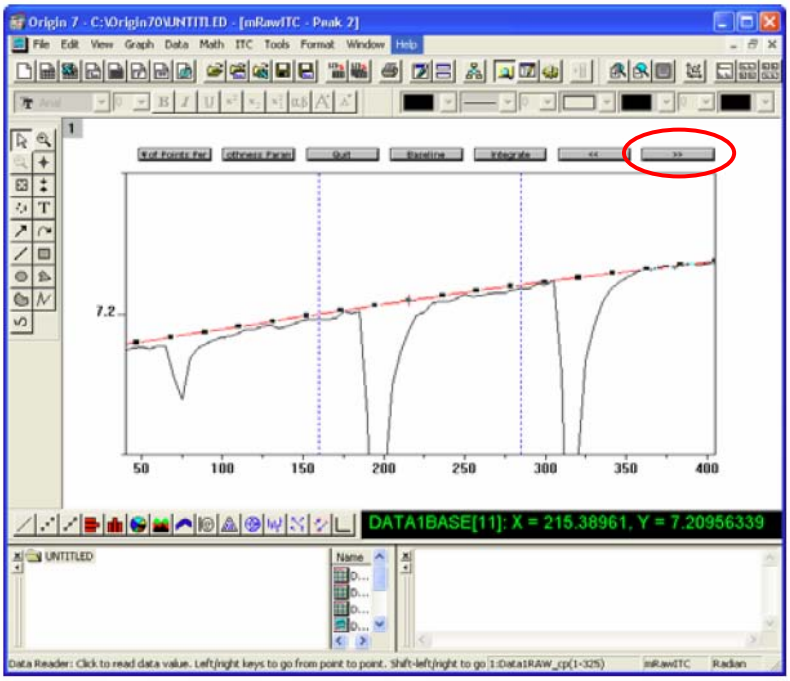




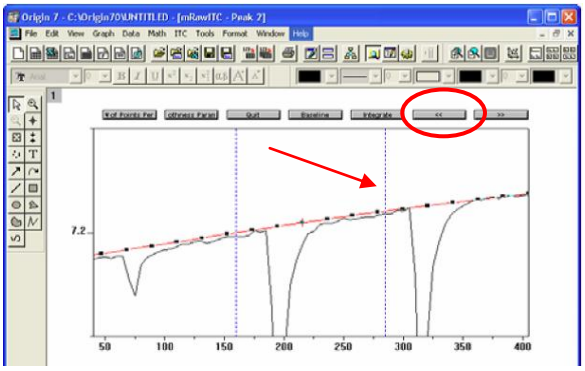
5. 黒いポイントにマウスの十字線をあわせてドラッグさせてベースラインを移動します。大まかな調整をするには、*# of Points Per...*をクリックして、必要なポイント数を入力します。推奨数は 8 です。ポイント数を変更したら、*Baseline* を再度クリックして表示を更新します。



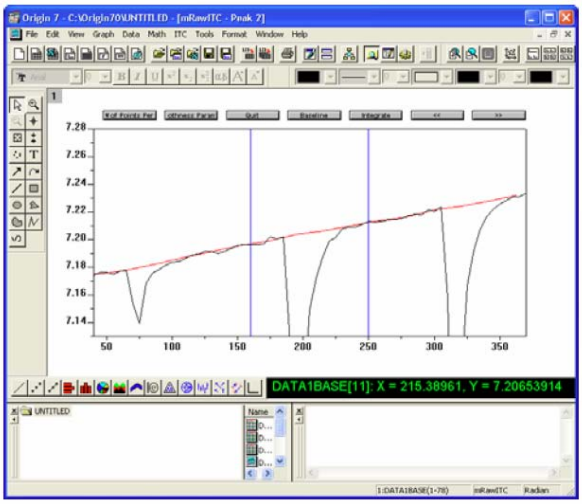
6. >>（進む）ボタンをクリックして次のピークに移動し、必要であれば 5.の作業を繰り返します。このようにして、すべてのピークの処理を続けます。



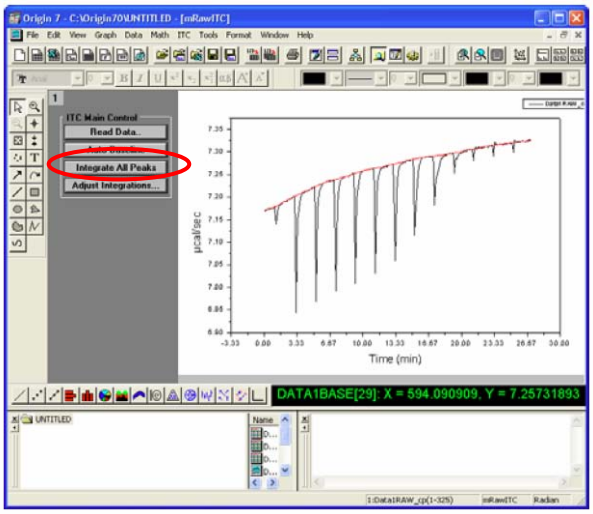
7. << ボタンをクリックして 2 番目のピークに戻ります。ピーク右側の青い境界マーカー（→）を、約 250 秒に左クリックでドラッグします。



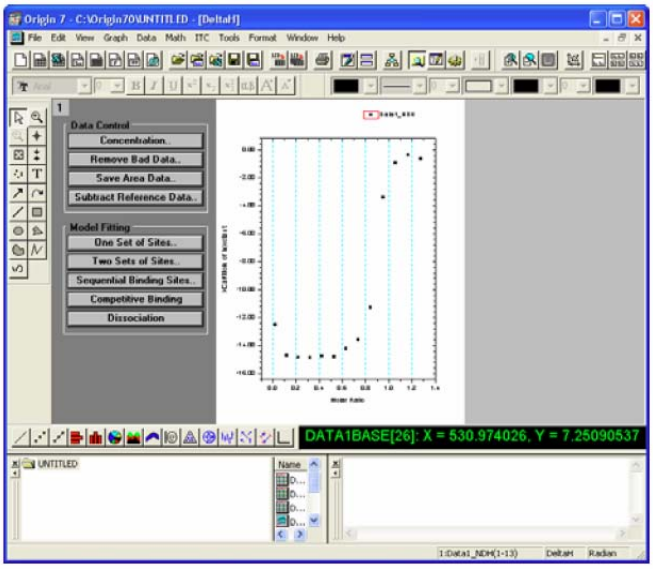
これにより、ピーク積分に使用されるデータ領域を調整し、ベースラインのノイズが積分結果に及ぼす影響を減らします。



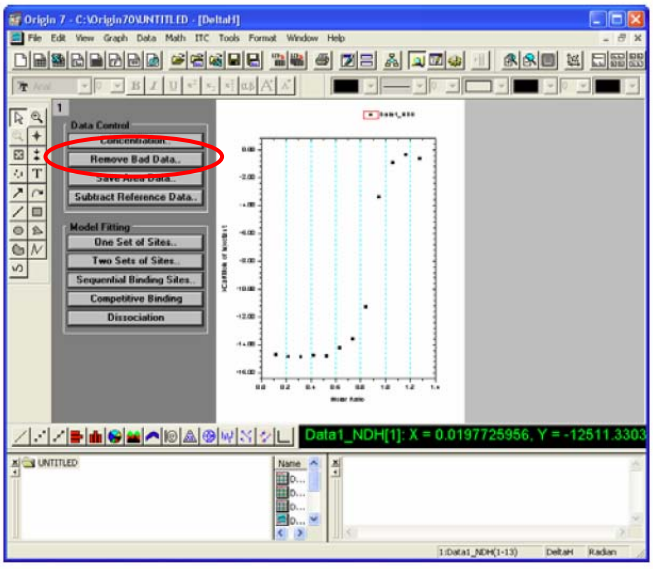
8. *Quit* をクリックして生データに戻ります。*Integrated all peaks* をクリックしてデータを再積分します。



9. ノーマライズされたΔH プロットが作成されます。



10. 1 回目の滴下を除くために、*Remove Bad Data* ボタンをクリックし、最初の点の上に十字線を合わせ、ダブルクリックしてデータ点を除きます。



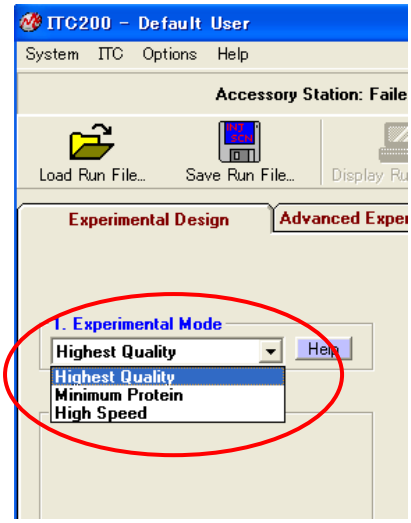
11. ソフトウェアは自動的に各ピーク面積を計算し、これらの値をモル比（リガンドモル濃度/高分子モル濃度）に対してプロットします。

12. 続けてコントロールデータを開き、2 から 11 の操作を繰り返します。その後の解析は P.33.「 2-7-2 画面上に 2 つのデータを表示」を参照してください。

2−7−8. Experimental Design を利用した実験デザイン

1. *Experimental Design* タブをクリックします

2. *1. Experimental Mode* を選択します。

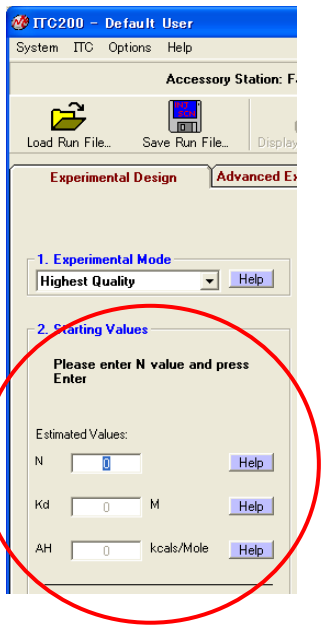


High Quality：C 値が 50 になるように設定します。クォリティーの高いデータを得るために必要なサンプル量を設定します。

Minimun Protein：C 値が 10 になるように設定します。滴定を成功させるための必要サンプル最低量を使用します。

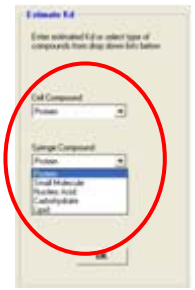
High Speed：長い時間をかけて 1 回だけ注入するモードです。（SIM）

3. ***2. Starting Value*** で N、Kd、ΔH、測定温度それぞれの予想値を入力後、エンターキーをクリックします。

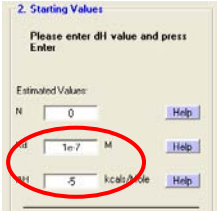


N：結合比

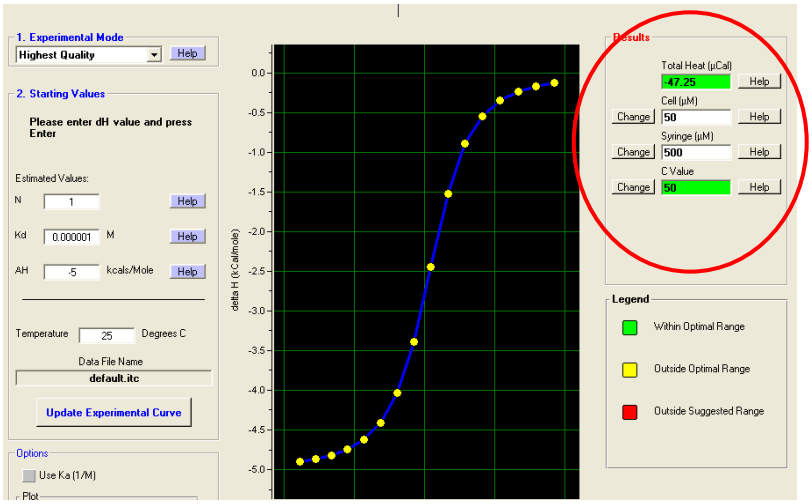
Kd：予想される解離定数値を入力します。わからない場合でも何らかの数字を入れる必要があります。*Help* ボタンをクリックするとセルとシリンジにそれぞれどのようなサンプルを充填するかを選択するメニューが現れます。濃度を入力するときは 1 μM であれば 1e-6 と入力します。



ΔH：分子間相互作用によって生じるトータルの熱量を入力します。たいていの熱量変化は -5 ～ -10 kcal/mole と考えられます。わからない場合はとりあえず-5と入力します。



4. *Update Experimental Curve* をクリックするとシミュレーション結果が表示され、*Results* にセル、シリンジの予測値に基づく必要サンプル濃度が表示されます。



Results にセル、シリンジの予測値の基づく必要濃度は *Change* ボタンで変更可能です。C 値の背景色が計算により、*Legend* に表示されているいずれかの色に変わります。

緑 ： 最良のデータが得られる最適値（C 値が 5～500）

黄 ： 有効範囲内であるが、最良なデータが得られない可能性がある（C 値が 1～5 および 500～1000）

赤 ： 使用可能なデータが得られる可能性が低い（C 値が 1 以下か 1000 以上）

5. シミュレーション結果に基づいて *Advanced Experimental Design* タブに測定パラメータが自動で表示されます。

メンテナンス

MicroCal iTC$_{200}$ の定期的メンテナンスは、信頼性のある結果を得るために最も重要となります。システム内での微生物増殖やタンパク質吸着などのコンタミネーションを避けることが重要です。

毎日のメンテナンス

システムは、*Cell and Syringe Wash* コマンドを使用して、各実行後に洗浄してください。洗浄方法は P.21.の 2-2. 測定前の洗浄作業、を参照してください。

毎週のメンテナンス

リファレンスセル内の超純水を交換してください。

長期間使用しないとき

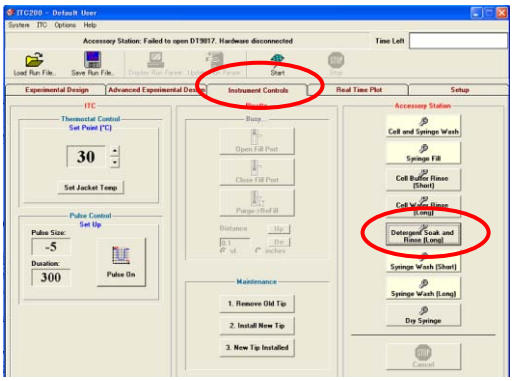
システムを長期間使用しない場合には、サンプルセルおよびリファレンスセルに超純水を充填してください。また、定期的に（2～3 週間に 1 度）超純水の交換を行ってください。

その他のメンテナンス

汚れがひどいときの洗浄方法

通常のメンテナンスでは汚れが落ちない場合は、より強力な洗浄を実施します。この作業は、水による洗浄では不十分なときに実施してください。セルの洗浄が必要かどうかをチェックする最も簡単な方法は、水―水インジェクション（P.51.参照）でベースラインの位置が設定したリファレンスパワーに比べて 1 µcal/sec 以上低くないことをチェックすることです。

1. ジャケット温度が 30℃以下であることを確認後、*Instrument Controls* タブ内にある *Detergent Soak and Rinse (long)* コマンドを使用し、指示に従って 20% Contrad-70（Decon 90）をセルに充填し、50℃で 30 分間、加熱します。



2. 滴定用シリンジの洗浄を行います。PCR チューブに 20% Contrad-70 を 100 µl セットします。
3. *Instrument Controls* タブ内にある *Accessory Station* の *Syringe Fill* で洗浄溶液を吸い、続けて *Pipet* の *Purge→Refill* を行います。
4. *Pipet* の *Distance* に「100」µl と入力し、洗浄溶液を押し出します。
5. 新しい洗浄溶液をセットし、3. 4.の操作を繰り返します。
6. *Accessory Station* の *Syringe Wash (Long)*で超純水による洗浄を行います。
7. メタノールが完全に乾燥していることをご確認ください。乾燥していない場合は *Accessory Station* の *Dry Syringe* を行ってください。

* Contrad-70 は Decon Laboratories 社の製品で、ドデシルベンゼンスルホン酸、水酸化カリウム、クエン酸ナトリウム、ラウリルエーテル硫酸ナトリウムなどを含んでいます。
この物質は極めて腐食性が強く、特に昇温した場合には十分な注意が必要です。目、皮膚、着衣には防護具を用いてください。

洗浄ボタンについて

Instrument Controls の *Accessory Station* にある *Cell and Syringe Wash* 以外のボタンの概要は以下の通りです。

Cell Buffer Rinse(Short): 次に測定使用とするリガンドの溶液が前回の溶液と同一で、セルのみ洗浄したい場合に使用します。(緩衝液ボトルの溶液を 3.5 ml セルに流します。)フィルポート・アダプターは保管位置に戻します。

Cell Water Rinse(Long): 20% Contrad-70 でセルをマニュアルで洗浄した後に使用します。(超純水を 12.5 ml セルに流します。フィルポート・アダプターは保管位置に戻します。

Syringe Wash(Short): 超純水を 1.5 ml シリンジに流し、次にメタノールを 1.5 ml シリンジに流します。その後、 シリンジを乾燥させます。

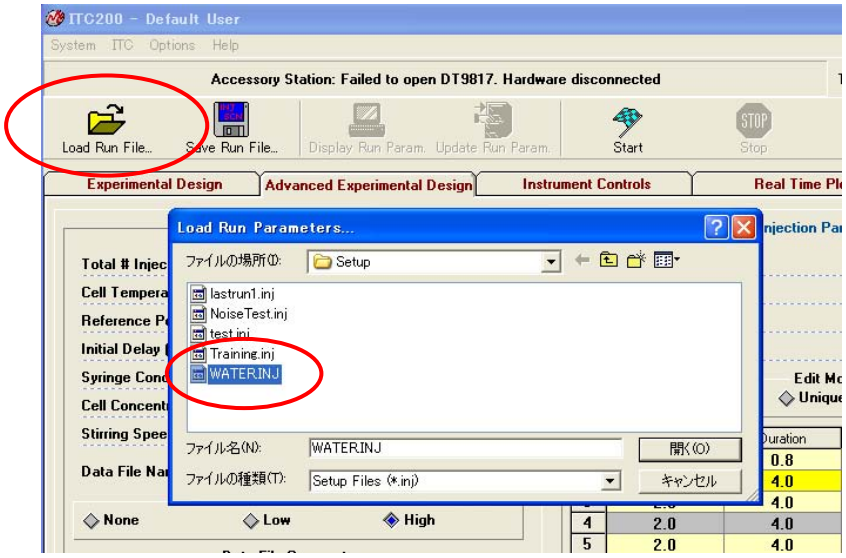
Syringe Wash(Long): 超純水を 2.5 ml シリンジに流し、次にメタノールを 2.5 ml シリンジに流します。その後、 シリンジを乾燥させます。

システムチェック

システムのコンディションを確認するために、サンプルセル、シリンジ両方に超純水を充填して滴定測定を行います。これを「水-水インジェクション」と呼んでいます。

この測定は、システムに不具合が生じた場合なども実施していただき、システムの状態を確認します。

1. *Load Run File...*をクリックすると *Load Run Parameters...*ウィンドウが開きます。
2. WATERINJ を開きます。



3. 各パラメータが以下の通りになっているか確認後、サンプルセルおよびシリンジに超純水を充填し測定を開始します。

Experimental Parameters

Total # Injections	19
Cell Temperature	30
Reference Power	5
Initial Delay	60
Stirring Speed	1000

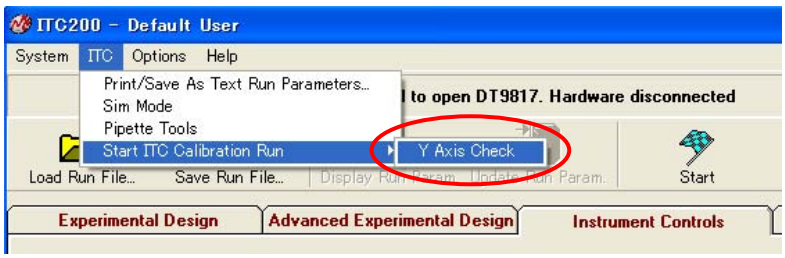
Injection Parameters

Volume	2
Duration	4
Spacing	120
Filter Period	5

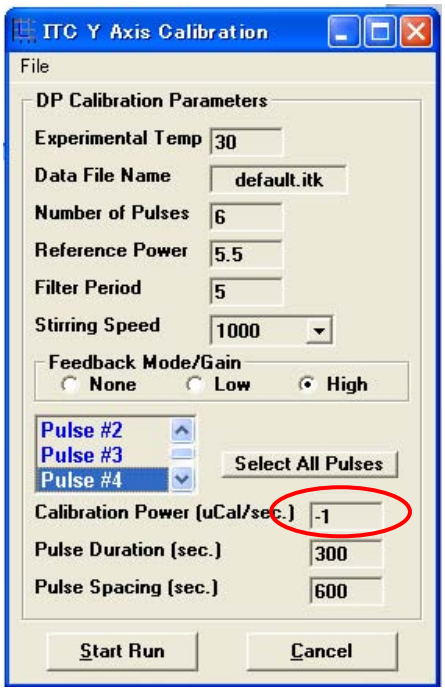
Y-Axis キャリブレーション

Y-Axis キャリブレーションは、セルの外部から一定の既知のヒートパルスを与え、正確な熱量（DP : Deferential Power）を測定しているかどうかを確認します。約 3 か月に 1 度行うことをおすすめいたします。

1. システムを立ち上げます
2. サンプルセル、シリンジに超純水を充填し、ピペットにセルをセットします。
3. メニューバーより、*ITC* > *Start ITC Calibration Run* > *Yaxis* を選択します。



4. *ITC Y Axis Calibration* ウィンドウから、*Data File Name* 以外は以下のようになっているかご確認ください。



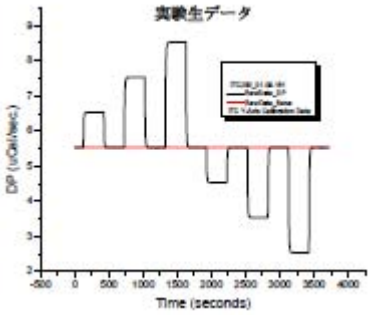
Pulse #	Calibration Power
1	1
2	2
3	3
4	-1
5	-2
6	-3

5. *Start Run* をクリックします。

6. ベースラインが安定したら、DP が赤より緑に変わります。DP をダブルクリックすると *Final Baseline Equilibration* が開始されます。

7. キャリブレーションが開始されます。

8. キャリブレーションが終了すると *Script Window* が自動的に立ち上がり、パルス・エネルギーをかけた値、得られた結果、入力値と結果の誤差が表示されます。*Script Window* は 1 度閉じると再度開くことはできませんので、測定が終了するまでは閉じないでください。測定終了後、ファイル名と同じ名前を付けて「.txt」として保存してください。



9. 計算された#3 と#6 のパルス・パワー、パルス・エネルギーの誤差が±1%以内であることを確認してください。

シャットダウン

1 日の測定がすべて終了したときや、通常の洗浄方法では洗浄が不十分な場合は以下の方法でサンプルセルと滴定シリンジを洗浄することをおすすめします。

1. ガスタイトシリンジに測定で使用した緩衝液と同じ組成の溶液を取り、ポンピングしながらサンプルセルを洗浄します。この操作を 3 回繰り返します。
2. ガスタイトシリンジに 20% Contrad-70 を取り、ポンピングしながらサンプルセルを洗浄します。この操作を 3 回繰り返します。
3. ガスタイトシリンジに超純水を取り、ポンピングしながらセルを洗浄します。この作業を 3 回繰り返します。
4. *Instrument Controls* の *Accessory Station* にある *Cell Water Rinse*(*Long*)をクリックし、ソフトウェアの指示に従って洗浄を行います。
5. サンプルセルの洗浄が終了したら、*Instrument Controls* の *Accessory Station* にある *Syringe Wash* をクリックし、ソフトウェアの指示に従って洗浄を行います。
6. *Main Window* 画面の *System* から *Quit Program*、または画面右上の をクリックします。
7. iTC_{200} システム背面の電源を Off にします。
8. PC をシャットダウンします。
9. 電源安定化装置、または UPS が備え付けられている場合は、これらの電源を Off にします。

【参考】

システムの電源は On のままでも問題はありません。On の状態であるほうが機器は安定します。2 週間以上使用しないことが分かっているような場合には電源を Off にすることをお勧めします。

消耗品の品名とコード番号

製品名	製品概要	包装	コード番号
Syringe, Injector, iTC200	本体付属の滴定用ガラスシリンジ（交換用）	1	SYA25038
Syringe, 500 μL, 3", 22GA, Blunt Tip	セルにサンプルを充填及びセルを洗浄する再に使用するガラスシリンジ	1	SYN50018P
Tube, Polypropylene PCR with Cap 200 μl	滴定ガラスシリンジへの自動サンプル充填用のディスポーザブルチューブ	1000	TTB501150
TIP PLUNGER 100 μl, Pack of 5	シリンジ自動サンプル充填用に用いるプランジャーチップ（交換用）	5	TIP130010-005

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告　誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意　誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁止　⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁止

電源コード・電源プラグを傷つけない

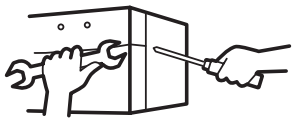
●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

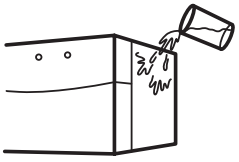
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

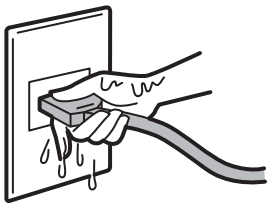
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

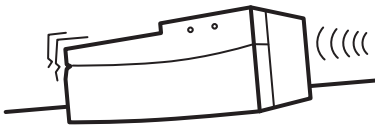
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

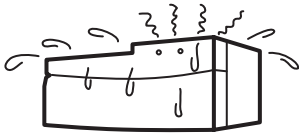
電源を入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL : 03-5331-9336

受付時間 9 : 00 ～ 17 : 30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

- **TEL：03-5331-9315**
- **FAX：03-5331-9349**

■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

- **TEL：03-5331-9336**

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品 ：1
ビアコア・MicroCal 関連製品：2
電気泳動関連製品 ：3
その他製品 ：4

- **FAX：03-5331-9370**
- **e-mail：Tech-JP@ge.com**

※ アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。
※ 主な製品マニュアルや製品 Q&A、ユーザートレーニング・Science Program の日程等は弊社 Web サイトで公開していますのであわせてご活用ください。

www.gelifesciences.co.jp

©2012 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

取扱店